

Degenerationsvorgänge am Innenohr und experimentelle Untersuchungen über Protektionsmöglichkeiten

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Tomas Sudavicius
aus Vilnius, Litauen

Frankfurt am Main, 2000
(D F 1)

Vom Fachbereich Biologie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. G. Trommer

Gutachter: Prof. Dr. R. Klinke
Prof. Dr. Ch. Winter

Datum der Disputation: 19. April 2001

Zusammenfassung

Hörverluste durch Innenohrschäden gelten beim Menschen und anderen Säugetieren als irreversibel. Deshalb wird es von vielen Wissenschaftlern versucht, eine Regeneration im Innenohr der Säugetiere zu induzieren oder das Ohr pharmakologisch vor Schädigung zu schützen. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob neurotrophe Wachstumsfaktoren Meerschweinchen vor experimentell ausgelösten Innenohrschäden schützen können.

Als erstes wurde in dieser Arbeit ein Tiermodell zur akuten und frequenzspezifischen Hörschädigung entwickelt. Meerschweinchen wurden Kanamycin und Ethakrynsäure intravenös infundiert. Es wurde festgestellt, daß die erwünschten frequenzspezifischen Hörverluste durch 266 mg/kg Kanamycin kombiniert mit 30 mg/kg Ethakrynsäure reproduzierbar induziert werden konnten. Die Hörschwellen und ihre Verluste wurden anhand der Summenaktionspotentiale vom Hörnerv bestimmt.

Anschließend wurde an Meerschweinchen eine Methode zur chronischen Applikation von Wachstumsfaktoren ausgearbeitet. Es wurden drei implantierbare Applikationssysteme getestet, das Mikrodosiersystem (MDS) aus der Tübinger HNO-Klinik, die wiederbefüllbaren ESOX-Pumpen und osmotische ALZET-Pumpen. Durch die osmotischen ALZET-Mikropumpen konnten neurotrophe Faktoren über einen Zeitraum von mehreren Wochen kontinuierlich und zuverlässig appliziert werden. Diese Pumpen wurden in Meerschweinchen implantiert und lieferten eine Lösung mit der Testsubstanz oder eine Kontrollösung, die an das runde Fenster der Cochlea oder in die Zerebrospinalflüssigkeit abgegeben wurden.

Im dritten Teil der Arbeit wurden die beiden entwickelten Methoden miteinander kombiniert. Damit war es möglich zu testen, ob der durch die Mikropumpen applizierte neurotrophische Faktor-3 (NT-3) die durch Ototoxika ausgelösten Schwellenverluste vermindert. Argumente für die Wahl von NT-3 waren, daß NT-3 *in vitro* bereits eine starke protektive Wirkung an den Neuronen des Spiralganglions erwiesen hatte (Marzella et al., 1997). Außerdem sind Rezeptoren für NT-3 auch bei adulten Tieren in den cochleären Haarzellen vorhanden. Die physiologische Wirkung von NT-3 war aber *in vivo* noch nicht untersucht worden.

Zu Beginn der Experimente wurden die Tiere mit Mikropumpen implantiert, die über 14 Tage eine NT-3-haltige oder Kontrollösung applizierten. Vier Tage nach Implantation der Pumpen wurden die Meerschweinchen durch die Infusion der oben genannten ototoxischen Arzneimitteln vertäubt. Die Hörschwellen wurden kurz bevor und über 32 Tage nach der Vertäubung gemessen. Die Hörschwellen der mit NT-3 behandelten Tiere wurden mit den

Hörschwellen der Kontrolltiere verglichen.

Durch die Infusion von Kanamycin und Ethakrynäure wurden bei Meerschweinchen Hörverluste in der Größenordnung von 40 dB induziert. Bei der Gabe von NT-3 an die rechten Cochleae wurden diese ototoxisch ausgelösten Schwellenverluste um 9 dB vermindert, und dies nicht nur auf der behandelten, sondern auch auf der kontralateralen Seite. Diese Befunde deuteten darauf hin, daß bei der lokalen Gabe die neurotrophen Faktoren auf systemischem Wege auch andere Seite erreichen und dort eine Wirkung ausüben. Ähnliche Effekte wurden auch bei lokaler Gabe von einem anderen neurotrophen Faktor, Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), beobachtet (Shoji et al., 2000). Die kontralaterale Wirkung war hier aber schwächer (3 dB), als die ipsilaterale (5 dB).

Die ins Ohr implantierten Pumpen verursachten *per se* Hörverluste von etwa 5 dB. NT-3 verminderte auch diese Hörverluste durchschnittlich um 4 dB.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der systemische Effekt von NT-3 geprüft. Dafür wurde NT-3 nicht lokal an das runde Fenster der Cochlea, sondern in die Zerebrospinalflüssigkeit appliziert. Die ototoxisch ausgelösten Hörverluste konnten durch den systemisch gegebenen NT-3 um 5 dB verringert werden.

Relativ zu den ototoxisch ausgelösten Hörverlusten in der Größenordnung von 40 dB war die Protektion durch systemisch (5 dB) oder lokal (9 dB) applizierten NT-3 gering. Die stärkste otoprotektive Wirkung durch Wachstumsfaktoren, von 12-18 dB, wurde bis jetzt durch gentechnisch in die Cochlea eingebrachten GDNF erreicht (Yagi et al., 1999). Der Schutzeffekt durch den lokal am Ohr gegebenen GDNF (5 dB, Shoji et al., 2000) war aber geringer, als der vom identisch verabreichten NT-3 (9 dB, diese Arbeit, s. auch Sudavicius et al., 2000). Wenn durch gentechnische Art des Verabreichens die Wirkung von NT-3 im gleichen Maße potenziert werden sollte, wie es bei GDNF der Fall ist, wäre die protektive Wirkung von NT-3 stärker als die von GDNF.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung

1.	Hörsinn und Hörschäden	1
2.	Funktionsweise des Innenohres und Entstehung von Summenaktionspotentialen	2
3.	Schädigung des Innenohres	6
3.1.	Aminoglykosid-Antibiotika	6
3.2.	Schleifendiuretika	8
4.	Protektion des Ohres vor einem Schaden	8
4.1.	Hemmung der Ototoxika-Aufnahme in die Haarzellen	9
4.2.	Schutz vor freien Radikalen	9
4.2.1.	Eisenchelatoren	9
4.2.2.	Radikalfänger	9
4.3.	Glutamatantagonisten	10
4.4.	Apoptosehemmer	10
4.5.	Wachstumsfaktoren	10
4.5.1.	Wachstumsfaktoren in der Cochlea	11
4.5.2.	Versuche mit Wachstumsfaktoren	12
4.5.2.1.	Histologische <i>in vitro</i> Experimente	12
4.5.2.2.	Histologische <i>in vivo</i> Experimente	13
4.5.2.3.	Physiologische Untersuchungen	14
5.	Vorhaben	15

Methodik

1.	Tiere und OP-Technik	17
1.1.	Narkose	17
1.2.	Operation	17
1.2.1.	Freilegen und Öffnen der Bulla	18
1.2.2.	Implantation der Elektroden	18
1.2.3.	Befestigung des Steckers	19
1.2.4.	Zunähen und Versorgung der Tiere nach der Operation	20
2.	Methode der experimentellen Hörschädigung	20
2.1.	Anforderungen an die Methode	20
2.2.	Dosierungen	20
2.3.	Intravenöse Infusion	22
2.3.1.	Legen der Kanüle	22
2.3.2.	Technik für die Infusion	23
2.3.3.	Infusionsabfolge	24
3.	Messung der Summenaktionspotentiale des Hörnervs	25
3.1.	Ablauf	25
3.1.1.	Tiere ohne Pumpe	25
3.1.2.	Tiere mit Pumpe	25
3.2.	Behandlung der Tiere vor der Messung	26
3.2.	Durchführung der CAP-Schwellenmessung	26
3.4.	Meßeinrichtung	26
3.4.1.	Reizkette	27
3.4.2.	Meßkammer	28
3.4.3.	Aufnahmekette	28
3.4.4.	Computereinheit. Erste Verarbeitung zur Eliminierung der Mikrofonpotentiale	29
3.5.	Bestimmung der Hörschwellen	29

3.6.	Auswertung.....	30
3.6.1.	Referenzhörschwelle.....	31
4.	Applikation der Wachstumsfaktoren.....	31
4.1.	Möglichkeiten der Wachstumsfaktorapplikation.....	31
4.1.1.	Intracochleäre Applikation.....	32
4.1.2.	Extracochleäre Applikation.....	32
4.2.	Pumpen für die Implantation.....	33
4.2.1.	ESOX.....	33
4.2.2.	MDS.....	34
4.2.3.	ALZET.....	34
4.3.	Pumpenkatheter.....	35
4.4.	Applikationskontrolle.....	35
4.4.1.	ELISA – Verfahren zur Konzentrationsbestimmung.....	35
4.4.2.	Versuche mit NT-3 <i>in vitro</i>	37
4.4.2.1.	NT-3 ELISA, Versuch I, Untersuchung von NT-3-Stabilität in Hank's Solution, Förderungsrate durch die ALZET-Pumpen.....	37
4.4.2.2.	NT-3 ELISA, Versuch II, Untersuchung der NT-3-Stabilität in Phosphatpuffer.....	38
4.4.2.3.	NT-3 ELISA, Versuch III, Untersuchung der Auswirkung von Pumpengröße und Hank's Lösungszusatz zur NT-3-Lösung.....	39
4.4.2.4.	NT-3 ELISA, Versuch IV, Untersuchung von NT-3 unterschiedlicher Produzenten und Einfluß von 1% Albumin in der Lösung.....	40
4.5.	Applikation des Wachstumsfaktors <i>in vivo</i>	41
4.5.1.	Implantation der ALZET-Pumpen.....	41
4.5.1.1.	Sterile OPs.....	41
4.5.1.2.	Implantation für lokale Applikation.....	41
4.5.1.3.	Implantation für systemische Applikation.....	42
4.5.2.	Infektionsverminderung.....	42
5.	Histologie.....	43
5.1.	Präparation der Cochleae.....	43
5.2.	Färbung.....	43
5.3.	Aufnahme und Montieren der Bilder.....	44

Ergebnisse

1.	Kontrollhörschwellen.....	45
2.	Modell der Hörschädigung.....	47
2.1	Mögliche Stärke der Hörschwellenverluste.....	47
2.1.1	Totaler Hörverlust.....	47
2.1.2	Frequenzspezifischer partieller Hörverlust.....	49
2.1.3	Keine Hörverluste.....	51
2.2	Die mittleren Hörverluste bei unterschiedlichen Dosierungen der Ototoxika.....	51
2.2.1	Ethakrynsäure 0 mg/kg.....	51
2.2.2	Ethakrynsäure 20 mg/kg.....	51
2.2.3	Ethakrynsäure 30 mg/kg.....	53
2.2.4	Ethakrynsäure 40 mg/kg.....	53
2.2.5	Die mittleren Hörschwellenverluste aller Dosierungen in Übersicht.....	55
3.	Applikation der Wachstumsfaktoren.....	56
3.1.	Auswirkung der Pumpenimplantation und der i.v. Infusion auf die Hörschwellen.....	56
3.2.	Wirkung von NT-3.....	59
3.2.1.	Hörschwellen der mit Pumpe implantierten Ohren.....	59
3.2.2.	Hörschwellen der nicht implantierten Ohren bei lokaler Applikation.....	62

3.2.3.	Systemische Applikation von NT-3 oder Albumin	62
3.3.	Protektive NT-3-Wirkung in Übersicht	66
4.	Morphologische Ergebnisse	66
4.1.	Fallbeispiele	67
4.2.	Allgemeine morphologische Befunde und Korrelation mit physiologischen Ergebnissen.	71

Diskussion

1.	Meerschweinchen als Versuchstiere. Chirurgische Eingriffe	72
2.	Hörschädigung der Meerschweinchen durch die intravenöse Applikation von Kanamycin und Ethakrynsäure	72
3.	Effekte der implantierten Pumpen	73
3.1.	Hörverluste durch die extracochleären Pumpen	74
3.2.	Katheter und ihre Endstücke	74
4.	Protektive Wirkung von NT-3 auf die Hörschwellen	75
4.1.	Physiologischer otoprotektiver Effekt durch lokal applizierten NT-3	75
4.1.1.	Protektion gegen einen gesetzten Hörschaden	75
4.1.2.	Protektion gegen die durch Pumpe ausgelösten Hörverluste	79
4.2.	Bilaterale Wirkung von NT-3	80
4.2.1.	Kontralaterale Wirkung von NT-3	80
4.2.1.1.	Additive Ototoxizität der neurotrophen Faktoren	81
4.2.1.2.	Wirkung der durch virale Vektoren transduzierten Wachstumsfaktoren	81
4.2.2.	Wirkung des in die Zerebrallflüssigkeit applizierten NT-3	82
4.3.	Otoprotektion durch Radikalfänger und Eisenchelatoren	83
4.4.	Aurale Entzündungen und Otoprotektion	83
5.	Vergleich der Hörschwellen und der Haarzellverluste	84
5.1.	Hörschwellenverluste und die Haarzellen	84
5.2.	Vergleich der extra- und intracochleären Applikationsmethoden	84
6.	Wirkungsmechanismus von NT-3	85
7.	Zusammenfassung der Rückschlüsse	87

Literaturverzeichnis	88
----------------------------	----

Einleitung

1. Hörsinn und Hörschäden

Das Hören ist einer der wichtigsten Sinne des Menschen. Die Fähigkeit, Schallereignisse der Umgebung wahrzunehmen, erlaubt dem Menschen und den Tieren sich besser der Umwelt anzupassen. Auch die Kommunikation zwischen Individuen beruht hauptsächlich auf der Hörfähigkeit. Deshalb bestimmt das Hören bei Menschen die Fähigkeit, sich kommunikativ in die Gesellschaft einzugliedern (Flanagan und Rabiner, 1993). Hörstörungen können diese essentiellen Fähigkeiten behindern und stellen massivste Einschränkungen bei der Ausbildung sozialer Kontakte dar.

Eine der häufigsten Ursachen für Hörverluste sind Innenohrschäden. Sie können durch mehrere Ursachen ausgelöst werden, z. B. durch Infektionen (Roizen, 1999; Berrettini et al., 1999), Sauerstoffmangel, Durchblutungsstörungen (Übersicht bei Borg, 1997), akustische Überlastung des Ohres (Raskandersen et al., 2000) oder chemische Stoffe (Loquet et al., 1999).

Manche Risikofaktoren, die einen Hörschaden hervorrufen können, sind schwer zu vermeiden. Dazu zählen Arzneimittel mit ototoxischer Nebenwirkung, wie Aminoglykosid-Antibiotika, die effektiv gegen Infektionen eingesetzt werden (Übersicht bei Forge und Schacht, 2000), oder Schleifen-Diuretika (Klinke et al., 1983). Ihre Anwendung ist bei lebensbedrohlichen Krankheiten manchmal unvermeidbar. Hörverluste durch strukturelle Schäden im Innenohr gelten bei Säugetieren als irreversibel. Eine Regeneration der geschädigten Strukturen wurde bei Säugern bis jetzt nicht nachgewiesen (Rubel et al., 1995).

Eine Wahrnehmung akustischer Ereignisse kann Schwerhörigen mit technischen Hilfsmitteln verbessert oder Gehörlosen sogar ermöglicht werden, bei Schwerhörigkeit mit Hörgeräten (Dillier, 1992) und bei Taubheit mit Innenohr-Implantaten (Rubinstein und Miller, 1999).

Der Ersatz von Stützzellen im vestibulären System adulter Meerschweinchen wurde bereits beschrieben (Rubel et al., 1995; Li und Forge, 1997). Nach einem ototoxischen Trauma durch Gentamicin können die Haarzellen im vestibulären Organ durch neue ersetzt werden. Es ist aber ungewiß, ob sie durch mitotische Teilung oder durch Transdifferenzierung aus anderen Zellen gebildet werden (Forge et al., 1998).

In der Cochlea adulter Säugetiere wurde bis jetzt keine Proliferation der sensorischen oder neuronalen Strukturen festgestellt (Rubel et al., 1995). So kann vermutet werden, daß die Haarzellen und andere zellulären Strukturen in der Cochlea im Laufe der Ontogenese nur einmal entstehen. Anders ist es bei Vögeln, bei denen die Regeneration der cochleären Haarzellen nach einem ototoxischen (Übersicht bei Smolders, 1999) oder akustischen Trauma (Ding-Pfennigdorff et al., 1998) ein spontaner Vorgang ist.

Das Überleben des sensorischen Epithels in organotypischen Kulturen und die Entwicklung sensorischer Strukturen in der Ontogenese wird durch Wachstumsfaktoren gesteuert (Übersicht bei Gao, 1998). Sie können *in vitro* die Haarzellen des Corti'schen Organs und die Neurone des Spiralganglions vor einem Schaden durch Ototoxine beschützen oder die Überlebenszeit dieser Zellen erheblich verlängern.

Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob NT-3, einer der wichtigsten neurotrophischen Faktoren für das Innenohr (Ernfors et al., 1995), auch *in vivo* vor Hörverlust schützen oder, wenn ein Hörverlust eingetreten ist, ihn sogar rückgängig machen kann. Ein positives Ergebnis dieser Versuche könnte einen Ansatz für die kausale Therapie der Innenohr-Schwerhörigkeit liefern.

2. Funktionsweise des Innenohres und Entstehung von Summenaktionspotentialen

Das Ohr ist ein Mechanorezeptororgan. Beim Menschen und den meisten Säugetieren ist das Ohr angepaßt die Druckwellen der Luft zu registrieren. Die aus der Umwelt ankommenden Schallwellen werden vom Außenohr gesammelt und durch den äußeren Gehörgang zum Trommelfell geleitet. Das Trommelfell und die Gehörknöchelchen sind die Bestandteile des Mittelohres, welche die Schallimpedanz der Druckwellen der Luft an die Schallimpedanz der Innenohrflüssigkeiten anpassen.

Das Innenohr besteht aus dem Vestibularapparat und der Cochlea. Der Vestibularapparat dient als Gleichgewichtsorgan, die Cochlea ist für die Transduktion von Schallwellen zuständig. Die Cochlea besteht aus drei membranösen, zu einer Schnecke gewundenen Kanälen (*Scala vestibuli*, *Scala media* und *Scala tympani*). In der mittleren, der *Scala media*, befindet sich das Corti'sche Organ mit vier, entlang der Längsachse der *Scala* liegenden Reihen von Haarzellen. Eine Reihe innerer und drei Reihen äußerer Haarzellen liegen in Stützzellen eingebettet auf der Basilarmembran, die *Scala media* und *Scala tympani*

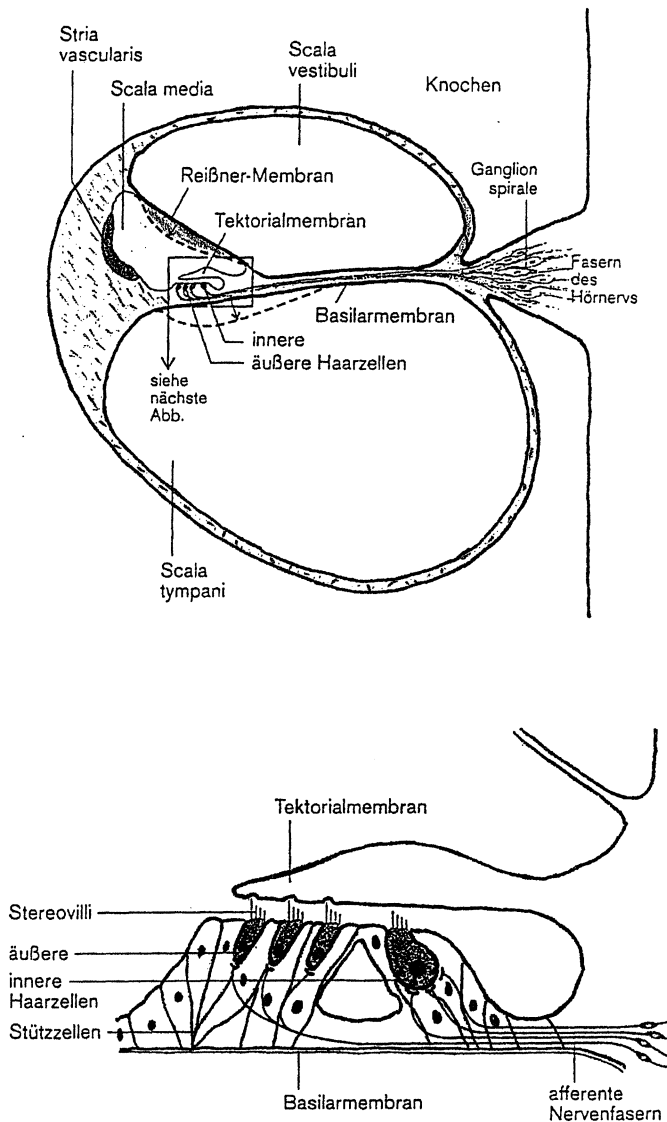


Abbildung 1. Schema eines Querschnitts durch die Säugetiercochlea (obere Abbildung) und das Corti'sche Organ (untere Abbildung) aus Klinke/Silbernagl (1996), verändert von Heid (1998).

voneinander trennt (s. Abbildung 1). Über den Haarzellen, in der *Scala media*, liegt die Tektorialmembran, die mit den Zilien der äußeren Haarzellen Kontakt hat (Engström und Engström, 1978).

Durch die Druckschwankungen, die durch die Gehörknöchelchen auf die Flüssigkeiten der Cochlea übertragen werden, werden die *Scalae* relativ zueinander bewegt (Fukazawa et al., 1999). Dies verursacht eine Scherbewegung zwischen der Tektorialmembran und den Haarzellen. Dadurch werden die Stereozilien der äußeren Haarzellen ausgelenkt, was den adäquaten Reiz für die Haarzellen darstellt (Davis, 1957). Die Zilien der inneren Haarzellen, die keinen direkten Kontakt zu der Tektorialmembran besitzen (Übersicht bei Lim, 1986), werden vermutlich durch Bewegungen der Flüssigkeit ausgelenkt (Sellick und Russel, 1980).

Das Ohr der Säugetiere kann nicht nur die überschwelligen Schallsignale empfangen, sondern auch die Reize nach Frequenzen differenzieren. Grund dafür ist die durch akustischen Reiz ausgelöste Wanderwelle in der Cochlea, die sich von basal nach apikal bewegt. An einer bestimmten, von der Schallfrequenz abhängigen Stelle erreicht sie ihr Amplitudenmaximum, die hohen Frequenzen an der Basis der Cochlea, die tiefen Frequenzen weiter nach apikal (von Békésy, 1960). Die Welle wird, vermutlich, durch die äußeren Haarzellen unter Energieverbrauch um einige Größenordnungen verstärkt (Übersicht bei Zenner, 1994). Dadurch wird das Maximum der Schwingung auf einem schmalen Abschnitt der Cochlea selektiv verstärkt. Dies erhöht die Frequenzunterscheidungs- und die Hörschwelle.

Die *Scala tympani* und die *Scala vestibuli* sind mit Perilymphe gefüllt, die eine hohe $[\text{Na}^+]$ – und niedrige $[\text{K}^+]$ – Konzentration hat und in der Zusammensetzung einer extrazellulären Flüssigkeit entspricht. Die *Scala media* enthält Endolympe, die durch ihre niedrige $[\text{Na}^+]$ - und hohe $[\text{K}^+]$ -Konzentration ähnlich der intrazellulären Flüssigkeit ist. Die Inhalte der Skalen unterscheiden sich nicht nur durch die Konzentration der Ionen, sondern sie besitzen auch unterschiedliche bioelektrische Potentiale (Übersicht, Klinke, 1987).

Die *Scala media* besitzt, relativ zu den extrazellulären Flüssigkeiten oder der Perilymphe, ein elektrisches Potential von + 85 mV. Die ionale Zusammensetzung der Endolympe und das bioelektrische Potential wird von der *Stria vascularis*, einem speziellen Epithel in der Wand der *Scala media*, konstant gehalten. Die Haarzellen, deren apikales Ende von der Endolympe und deren Zellkörper von der Perilymphe umspült sind, besitzen relativ zu der Perilymphe ein negatives Potential, die inneren Haarzellen von – 40 mV, die äußeren Haarzellen von – 70 mV. Dadurch liegt an der apikalen Membranplatte der Haarzellen, die

mit der Endolymphe der *Scala media* im Kontakt steht, eine Potentialdifferenz von 155 mV bzw. 125 mV (z. B. Russel, 1983; Gitter und Zenner, 1990).

Die Potentialdifferenz zwischen den Haarzellen und der Perilymphe dient zum Auslösen von Rezeptorpotentialen der Haarzellen. Durch die Auslenkung der Stereozilien der Haarzellen werden Ionenkanäle, höchstwahrscheinlich mechanisch, geöffnet (mechano-elektrische Transduktion) und die Haarzellen depolarisiert (z.B. Assad et al., 1991). Dies führt zu einem Anstieg des $[Ca^{+2}]$ - Pegels in den inneren Haarzellen und daraufhin zu einer Freisetzung von Glutamat (Übersicht bei Klinke, 1986; Bobbin und Caesar, 1987; Eybalin et al., 1996). Glutamat, als afferenter Transmitter, löst exzitatorische postsynaptische Potentiale in Neuronen aus. Die afferenten Fasern des Nervus acusticus leiten diese Nervenpotentiale weiter zum Gehirn.

Nach einem kurzen akustischen Signal (Klick oder einem Tonpuls) werden mehrere Fasern des Hörnervs gleichzeitig angeregt. Mit Elektroden, die in der Nähe der Cochlea und dadurch auch nah am Hörnerv lokalisiert sind, können die synchronen Nervenpotentiale als Summenaktionspotentiale (compound action potential: **CAP**) abgeleitet werden. In unseren Versuchen wurde der physiologische Zustand der Ohren anhand von CAPs beurteilt.

Im Hörnerv der Säugetiere gibt es außer den afferenten Nervenfasern, die bei der Ratte ca. 80% aller Nervenfasern des Hörnervs ausmachen, auch etwa 20 % efferenter Nervenfasern (Dannhof und Bruns, 1993). Über 90% der afferenten Neurone haben nur eine afferente synaptische Verbindung mit einer einzigen inneren Haarzelle (Morrison et al. 1975). Eine innere Haarzelle hat etwa 20 synaptische Kontakte mit vorwiegend afferenten Fasern (Spoendlin, 1969). Die äußeren Haarzellen der Katzen haben Verbindung mit etwa sechs (bis neun) vorwiegend efferenten Nervenfasern (Liberman et al., 1990). Jede efferente Nervenfasern, die an den äußeren Haarzellen endet, innerviert etwa 10-50 Haarzellen.

Die äußeren Haarzellen, wie bereits erwähnt, erfüllen die Verstärkerfunktion und haben eine niedrigere Schwelle als die inneren Haarzellen (Ryan und Dallos, 1975, Übersicht bei Dallos 1992). Ein Verlust der äußeren Haarzellen erhöht die CAP - Schwelle um etwa 40 dB (Kim, 1986). An dem CAP sind die äußeren Haarzellen nur insoweit beteiligt, daß sie die Schallsignale verstärkt an die inneren weiterleiten. Der Mechanismus dieser Vorgänge ist noch nicht endgültig geklärt. Bekannt ist, daß der Verlust der inneren Haarzellen einen absoluten CAP-Verlust bedingt (Durrant, 1998).

3. Schädigung des Innenohres

Hörverschlechterung kann durch diverse Einflüsse der Umwelt ausgelöst werden. Zu den Noxen zählen sowohl physikalische (Schall- oder Knalltrauma, Übersicht bei Pfander, 1975) als auch chemische Faktoren, z.B. ototoxisch wirksame Arzneimittel (Übersichten bei Forge und Schacht, 2000; Nadol, 1993). Die Anwendung solcher Arzneimittel ist manchmal für Patienten unausweichlich. Zu solchen Pharmaka gehören mehrere Cytostatika, Diuretika und Antibiotika (Komune und Snow, 1981).

3.1. Aminoglykosid-Antibiotika

Vor ca. 50 Jahren wurde die Neurotoxizität von Streptomycin (Brown und Hinshaw, 1946) erkannt. Innerhalb von fünf Jahren wurde auch die gehörschädigende Wirkung dieser Antibiotika festgestellt (Berg, 1951; Hawkins und Lurie, 1952). Auch später eingeführte Antibiotika dieser Klasse (Aminoglykoside) haben ototoxische Nebenwirkungen (z.B. Gentamicin, Wersäll et al. 1971 oder Tobramycin, Brummett et al. 1971).

Nach dem Mechanismus der Hörschädigung durch die Aminoglykoside wurde lange gesucht. Einer der ersten Befunde wurde mit Hilfe der Elektronenmikroskopie gemacht: die Aminoglykoside schädigen die Haarzellen im Sinnesepithel des Innenohres (Wersäll und Hawkins, 1961). Sie schädigten die Haarzellen des Innenohres nicht nur bei Säugetieren, sondern auch bei Vögeln (Fermin und Igarashi, 1983), Lurchen (Harada, 1977) oder auch die Haarzellen des Seitenlinienorgans bei Fischen (Wersäll und Flock, 1964). Eine mögliche Ursache dieser Schäden könnte die irreversible Inhibition der Synthese von Phosphoinositiden in der Cochlea sein. Die Inhibition wurde sowohl *in vitro* (Schacht, 1976a) als auch *in vivo* (Schacht, 1976b) nachgewiesen. Die Phosphoinositol-Lipide sind obligate Bestandteile mehrerer Membranstrukturen, wie Mitochondrien, Golgi-Apparat oder endoplasmatisches Retikulum. Die veränderte Zusammensetzung der Membranen beeinträchtigt den Stoffwechsel der Zellen.

Andere Versuche haben den Weg der Aminoglykoside in den Haarzellen untersucht, wie sie aktiv in die Haarzellen aufgenommen werden (Hashino und Shero, 1995). Die Akkumulation und eventuell auch die Aufnahme der Aminoglykoside in die Zellen ist vom Myosin abhängig (Richardson et al., 1997). Mit goldmarkiertem Gentamycin wurde festgestellt, daß Aminoglykoside nach der Pinocytose in die Lysosomen gelangen (De Groot

et al., 1990), etwa ein Tag nach der Gabe der Ototoxika. Zwei bis drei Tage später platzen die mit Aminoglykosiden geladenen Lysosomen und die Zelle wird von Innen zerstört (Hashino et al., 1997).

Weitere mögliche Mechanismen der Hörschädigung werden diskutiert. Zum Beispiel, die Tatsache, daß Aminoglykoside sich in der Perilymphe akkumulieren, könnte mit den Schäden auch in anderen Bereichen der Cochlea zusammenhängen (Desrocher und Schacht, 1982). Die Aminoglykoside, die ihre Wirkung durch irreversible Bindung an die Bakterienribosome ausüben, könnten z.B. die Ribosome der Mitochondrien schädigen, da diese den bakteriellen Ribosomen sehr ähnlich sind (Übersicht bei Schlegel, 1992).

Eine weitere Theorie stützt sich auf die Tatsache, daß Aminoglykoside die Produktion von freien Sauerstoffradikalen im Innenohr induzieren (Sha und Schacht, 1999; LopezGonzalez et al. 1999). Die Entstehung der freien Sauerstoffradikale ist aber nur unter Anwesenheit der „aktivierter Form“ von Aminoglykosiden möglich (Übersicht bei Schacht, 1993). Als aktivierte Form dieser Antibiotika wird ein Komplex mit Eisen diskutiert (Priuska und Schacht, 1995). Durch die Gabe von Eisen-Chelatoren konnten die Schädigungen des vestibulären Systems und der Cochlea verringert werden (Song und Schacht, 1996; Yamasoba et al., 1999). Diese Theorie steht im Einklang mit der Tatsache, daß auch die überlaute Beschallung eine Produktion freier Radikale im Innenohr induziert (Yamane et al. 1995).

Primäre Schäden der Cochlea durch Aminoglykoside können nicht nur durch den Verlust der Haarzellen zustande kommen (Wersäll et al., 1971), deren evidenter anatomischer Verlust mit den physiologischen Verlusten einhergeht. Diese Ototoxine schädigen primär auch die Ganglienzellen (Sone et al., 1998). Degeneration der Ganglienzellen wurde früher nur in Verbindung und erst als Folge der Haarzellverluste betrachtet. Ein weiterer Angriffspunkt der Aminoglykosid-Antibiotika sind die Stützzellen. Diese Ototoxika verursachen primär auch Schäden an den Hensen-Zellen im Corti'schen Organ (Todt et al., 1999).

Sehr oft gibt es starke Schwankungen zwischen den Hörverlusten einzelner gleich behandelter Individuen. Cortopassi und Hutchin (1994) haben einen Mechanismus der höheren Empfindlichkeit durch Mutation der ribosomalen Mitochondrien-Gene vorgeschlagen. Eine andere Theorie besagt, daß die Hörschäden mit der Konzentration der Aminoglykoside in der Cochlea durch eine sigmoide Funktion verbunden sind (Beaubien et al., 1995). Neben den individuellen Unterschieden, die auf familiärer Vererbung basieren (Übersicht bei Lehnhardt, 1984), spielt auch die Tierrasse eine große Rolle. Bei Albino-Tieren

wurde durch eine Ototoxika-Dosis ein stärkerer Hörverlust ausgelöst, als die gleiche Dosis bei pigmentierten Tieren induzierte (Conlee et al., 1995). Ebenso durch eine Verminderung des Proteingehaltes im Tierfutter (von 18,5% auf 7%) wurde die Empfindlichkeit gegenüber Aminoglykoside erhöht (Lautermann und Schacht, 1996).

3.2. Schleifendiuretika

Eine andere Klasse der ototoxisch wirksamen Arzneimittel stellen die Schleifendiuretika dar. Ethakrynsäure (Schneider und Becker, 1966) oder Furosemid (Brown et al., 1996) verursachen einen akuten Hörverlust, dessen Dauer von vorübergehend (Ng et al., 1969, Klinke und Mertens, 1988) bis chronisch (Schwarz et al. 1970) variieren kann. Die Dauer der transienten Hörverluste durch Schleifendiuretika sowie die Dosis, die bei 50% der Tiere einen Hörverlust auslöst (Klinke et al., 1981), sind nicht bei allen Wirkstoffen gleich. Furosemid und Piretanid lösten kurzzeitigere Hörverluste aus als Bumetanid (Göttl et al., 1985). Die durch Ethakrynsäure allein verursachten Hörschäden waren bei Meerschweinchen auch nur transient (Ernst, 1972).

Die ototoxische Wirkung der Schleifendiuretika kann durch die gleichzeitige Applikation von Aminoglykosiden potenziert werden. Eine der effektivsten Kombinationen aus Aminoglykosiden und Schleifendiuretika sind Kanamycin und Ethakrynsäure (West et al. 1973, Xu et al., 1990). Kanamycin wurde intraperitoneal (i.p.) appliziert, Ethakrynsäure, deren Resorption stärkeren Schwankungen unterliegt, wurde intravenös (i.v.) gegeben. Die genaue zeitliche Abstimmung der nacheinander folgenden Injektionen hat ebenfalls eine Bedeutung. Die Verluste der äußeren Haarzellen waren am stärksten, wenn die Ethakrynsäure sofort oder bis zu vier Stunden nach Kanamycin infundiert wurde (Brummett et al., 1979). Partielle Verluste der akustischen Hirnstammpotentiale (Auditory Brainstem Response, **ABR**) konnten durch individuell herabgesetzte Dosierungen von Kanamycin (von 400-0 mg/kg) und Ethakrynsäure (von 40-0 mg/kg) bei Affen (*Macaca fascicularis*) ausgelöst werden.

4. Protektion des Ohres vor einem Schaden

Um bleibende Innenohrschäden zu vermeiden, gibt es zwei theoretische Wege: Schutz des Ohres vor der Schädigung oder Reparatur (Erholung) der geschädigten Strukturen nach dem Schaden.

4.1. Hemmung der Ototoxika-Aufnahme in die Haarzellen

Um den Schaden zu vermeiden, wenn Ototoxine bereits im Körper sind oder in Kürze appliziert werden, können mehrere Strategien der Therapie in Betracht kommen. Die erste Möglichkeit wäre, die Wirkung der Toxine zu vermindern oder ganz zu vermeiden. Zum Beispiel, durch die Gabe von Concanavalin A, welches die Aufnahme von Aminoglykosiden in die Haarzellen blockiert (Zheng und Gao, 1999). Dadurch werden die Haarzellen vor ototoxischen Wirkung geschützt.

4.2. Schutz vor freien Radikalen

4.2.1. Eisenchelatoren

Die zweite Strategie befaßt sich mit der Verminderung der Toxizität der hörschädigenden Substanzen oder ihrer Sekundärprodukte. Es wurde festgestellt, daß die Ototoxizität der Aminoglykosid-Antibiotika mit der Produktion freier Sauerstoff-Radikale einher geht (Sha und Schacht, 1996). Die mutmaßliche Komplexbildung der Antibiotika mit Eisen war der Grund, Eisenchelatoren gegen die Ototoxizität von Gentamicin einzusetzen. Die Chelatoren entziehen dem Komplex Eisen und verhindern die Entstehung von freien Radikalen. Die Gabe von Dihydroxybenzoat verminderte den induzierten Verlust der ABRs bei 18 kHz um 15-25 dB (Song et al., 1997). Dieser Eisenchelator hat auch die Schäden durch Kanamycin oder Streptomycin sowohl in der Cochlea, als auch im vestibulären System vermindert (Song et al., 1998).

4.2.2. Radikalfänger

Der andere Weg zur Innenohrprotektion war die Inaktivierung der bereits entstandenen freien Radikale. Durch die Gabe des Radikalfängers WR2721, der als Schutzmittel gegen die Radioaktivität eingesetzt wird, konnte die ototoxische Wirkung von Kanamycin vermindert werden (Pierson und Möller, 1981). Ein anderer Radikalfänger, N-Acetylcystein, hat keinen Schutz gegen Kanamycin verliehen (Bock et al., 1983).

Der körpereigene Antioxidant und Radikalfänger Glutathion, der bei der Entgiftung des Körpers eine der wichtigsten Rollen spielt, zeigte eine otoprotektive Wirkung (Garetz et al., 1994). Daß Glutathion eine besondere Rolle bei der allgemeinen Otoprotektion hat, bestätigen Versuche mit Entzug von Glutathion. Dadurch wurden die Hörschäden erhöht, die durch Kanamycin und Ethakrynsäure (Hoffman et al., 1988), Cisplatin (Lauterman et al., 1995)

oder auch Beschallung (Yamasoba et al., 1998) ausgelöst wurden. Jüngstens getestetes D-Methionin zeigte noch stärkere otoprotektive Wirkung gegen Gentamicin-induzierte Hörverluste in einer Größenordnung von bis zu 45 dB (Sha und Schacht, 2000).

4.3. Glutamatantagonisten

Durch akustische Traumata werden die synaptischen Verbindungen zwischen den Haarzellen und Dendriten der Hörnervenfasern beschädigt (Robertson, 1983). Es wird vermutet, daß Schäden an Dendriten durch die Freisetzung großer Mengen von Glutamat aus den inneren Haarzellen zustande kommen. Durch Glutamat-Antagonisten konnten die durch Beschallung gesetzten Schäden vermindert werden (Puel et al., 1998). Auch bei akuter Hörschädigung durch Kanamycin und Ethakrynsäure wird ein Glutamat-Konzentrationsanstieg in der Cochlea registriert (Matsuda et al., 2000). Dies läßt vermuten, daß exzessive Glutamat-Freisetzung aus den Haarzellen eine ebenso generelle Erscheinung bei Hörverlusten ist, wie die Produktion von freien Radikalen.

4.4. Apoptosehemmer

Die durch Noxen stark geschädigten Haarzellen werden binnen einiger Tage vom Gewebe abgestoßen (Hu et al., 2000). Die apoptotischen Prozesse können durch Inhibitoren unterbunden werden. Verschiedene Untersuchungen zeigen die schützende Wirkung solcher Inhibitoren gegen akustische Schädigungen (Wang et al., 1999), Schäden durch Hypoxie (Cheng et al., 1999), Aminoglykosiden (Nakagawa et al., 1998) und Cytostatika (Liu et al., 1998).

4.5. Wachstumsfaktoren

4.5.1. Wachstumsfaktoren in der Cochlea

Die Entwicklung der Cochlea und der Aufbau mit Ausdifferenzierung einzelner Strukturen erfolgt unter Einwirkung von mehreren Faktoren. Neurotrophen Wachstumsfaktoren (insbesondere den Neurotrophenen) wird dabei eine besondere Rolle zugeschrieben. Es wird vermutet, daß sie diese Entwicklung steuern oder sogar veranlassen (Fritzsch et al., 1999).

Mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung wurde in der Cochlea und im Spiralganglion nach bekannten Wachstumsfaktoren gesucht. Besonderes Interesse wurde der Entwicklungsperiode geschenkt, in der die cochleären Strukturen sich organisieren und die Neurone synaptische

Kontakte mit den Haarzellen bilden. mRNAs von zwei Neurotrophinen, **Neurotrophin-3 (NT-3)** und **Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)** wurden in der Zeit der Innervationsentwicklung im Spiralganglion gefunden (Pirvola et al., 1992). Die mRNAs dieser Faktoren werden in der ersten postnatalen Woche sowohl in den inneren als auch in den äußeren Haarzellen des Corti'schen Organs der Ratten exprimiert (Ylikoski et al., 1993).

Auch die RNA des **Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)**-Rezeptors- α wurde bei Ratten in allen Altersstufen in den Neuronen des Spiralganglions gefunden (Ylikoski et al., 1998). Später wurde die Produktion sowohl von GDNF und anderen Faktoren der GDNF-Familie (Neuritin, Artemin, Persephin) als auch der Rezeptor-Untereinheiten c-ret und GFR α -1 (die Untereinheiten des hochaffinen GDNF-Rezeptors) in der Cochlea bestätigt (Stöver et al., 2000a). Expression dieses Wachstumsfaktors und seines Rezeptors wurde sowohl im sensorischen Epithel als auch im Modiolus und der lateralen Cochleawand adulter Ratten nachgewiesen. Die genaue GDNF-Funktion in der Cochlea wurde noch nicht untersucht.

BDNF-, trkB-, NT-3- oder trkC-knock-out Mutanten (Tiere mit ausgeschalteten Genen) wurden in mehreren Experimenten eingesetzt. Ohne BDNF oder dessen Rezeptor TrkB entwickelt sich die Innervierung der äußeren Haarzellen des Corti'schen Organs nur schwach und das vestibuläre System wird gar nicht innerviert (Fritzsche et al., 1998). TrkB-Expression ist aber auch noch von basic fibroblast growth factor (FGF-2) abhängig (Brumwell et al., 2000).

Die Abwesenheit von NT-3 oder seinem Rezeptor TrkC vermindert die Innervierung der inneren Haarzellen und die Dichte der Neurone im Spiralganglion um 85%, vorwiegend in der Basis der Cochlea (Erfors et al., 1995). Wenn beide Faktoren oder ihre Rezeptoren fehlen, wird das komplette Innenohr nicht innerviert. Die Innervierung des Innenohres bei den trkB- und trkC-knock-out Mäusen entwickelt sich anfänglich normal, dann aber ziehen sich die Neurone von den Haarzellen zurück und degenerieren (Schimmang et al., 1995). Die Mutation wirkt sich nur in der sensorischen Peripherie des Nervensystems aus, das zentrale Nervensystem wird nicht betroffen (Silos-Santiago et al., 1997).

Das heißt, für die Entwicklung der Innervierung des sensorischen Epithels sind BDNF und NT-3 essentiell. Das weitere Bestehen synaptischer Kontakte wird durch diese Neurotrophine sowie durch andere Mechanismen gesteuert (Übersicht bei Fritzsche et al., 1997).

trkB wird bei Mäusen nur in den Haarzellen des Corti'schen Organs an postnatalen Tagen 5-13 exprimiert, während der Synapsenbildung zwischen den Neuronen des Spiralganglions und den Haarzellen. Auch BDNF wird nur in den Haarzellen produziert, so daß BDNF und sein Rezeptor TrkB in den selben Zellen vorhanden sind (Knipper et al., 1996).

In adulten Ratten wurden trkB Rezeptoren im Spiralganglion und im apikalen Teil der Cochlea in den äußeren Haarzellen gefunden (Malgrange et al., 1998). BDNF wird von Haarzellen im adulten Tier nicht mehr produziert. So kann BDNF eine Funktion in der Entwicklung der Cochlea spielen, dennoch aber keine Auswirkung auf das Bestehen der Synapsen bei adulten Tieren haben.

Im vestibulären System wurde festgestellt, daß vor der Innervationsentwicklung BDNF exprimiert wird. Nach Ausbilden der synaptischen Verbindungen zwischen den Haarzellen und Neuronen wurde (anstelle von BDNF) GDNF-Expression gefunden (Haschino et al., 1999). GDNF-Produktion im sensorischen Epithel der Cochlea bei adulten Ratten schließt nicht aus, daß GDNF auch für Aufrechterhaltung der synaptischen Kontakte im Corti'schen Organ verantwortlich sein könnte.

NT-3 wird in den inneren Haarzellen sowohl während der Entwicklung als auch in adulten Tieren produziert (Ylikoski et al. 1993). Die Haarzellen, besitzen den entsprechenden TrkC Rezeptor, aber der Wirkungsort von NT-3 ist nicht auf die Haarzellen beschränkt. Sowohl während der Entwicklung als auch im adulten Stadium wurden trkC Rezeptoren in Neuronen des Spiralganglions (Ernfors et al., 1992) und in der *Stria vascularis* gefunden (Malgrange et al. 1998). Dies deutet auf eine Kommunikation der Haarzellen mit anderen Strukturen hin, wobei NT-3 als Medium dienen kann.

4.5.2. Versuche mit Wachstumsfaktoren

4.5.2.1. Histologische *in vitro* Experimente

Als eine mögliche Rolle der Wachstumsfaktoren bei der Entwicklung des Innenohres bekannt wurde, wurden sie als Wirksubstanzen *in vitro* getestet.

Die Wirkung der Neurotrophine wurde zuerst an explantierten Neuronen des Spiralganglions getestet. Die Neurone wurden dazu in einem Zellkulturmedium 72 h inkubiert. Dabei überlebten von ihnen nur 2% (Staecker et al. 1995). Durch den Zusatz von 10 ng/ml NT-3 in das Medium konnte die Anzahl der überlebenden Neurone auf 52% erhöht werden. Ein Zusatz von BDNF (10 ng/ml) ins Medium erhöhte die Anzahl der überlebenden Neurone auf 7%.

In späteren Versuchen wurde nicht nur die trophische (das Überleben und Stoffwechsel fördernde), sondern auch die tropische (wachstumsfördernde) Wirkung von NT-3 bewiesen. Unter Anwesenheit von 10 ng/ml NT-3 wurde ein Auswachsen der Neurone des Spiralganglions in der Zellkultur induziert (Malgrange et al., 1996).

Der Schaden an Neuronen des Spiralganglions, der durch 4-6 µg/ml Cisplatin im Zellkulturmedium entstand, konnte *in vitro* durch eine Gabe von 50 ng/ml BDNF vermindert werden. Der Zusatz von 1 mM D-Methionin hat diese schützende Wirkung noch verstärkt (Gabaizadeh et al., 1997). Protektive Wirkung dieser Substanzen wurde in diesem Versuch auch an Haarzellen beobachtet.

Wirkung von NT-3 *in vitro* konnte durch Zusatz anderer Stoffe auch potenziert werden. Die neoplastischen Faktoren, Leukaemia inhibitory factor (**LIF**, Marzella et al., 1997), Transforming-growth-factor-β3 (**TGF-β3**, Marzella et al., 1998) oder ein weiteres Neurotrophin, Ciliary derived neurotrophic factor (**CNTF**), konnten die trophische Wirkung von NT-3 an den Ganglienzellen konzentrationsabhängig verstärken.

Auch andere Wachstumsfaktoren konnten ihre neurotrophische oder protektive Wirkung *in vitro* beweisen. *In vitro*-protektive Wirkung von Transforming growth factor-alpha (**TGF-α**) wurde an Organkulturen der Cochlea demonstriert. Durch Zugabe von TGF-α wurden die Stütz- und Haarzellen vor Schädigung durch Neomycin geschützt (Romand und Chardin, 1999). Diese TGF-α-Wirkung konnte mit Insulin noch potenziert werden. Auch durch extern zugefügtes GDNF wurde das Überleben der Spiralganglionneurone im Zellkulturmedium unterstützt (Pirvola et al., 1996).

4.5.2.2. Histologische *in vivo* Experimente

Es gibt auch Berichte über die *in vivo* Versuche mit neurotrophen Wachstumsfaktoren (Staecker et al., 1996). Fünf Tage nach Gabe von Kanamycin und Ethakrynsäure wurden voll ertaubte Meerschweinchen mit intracochleären Mikropumpen implantiert. Vier Wochen lang wurde NT-3- oder BDNF-Lösung (1 mg/ml, 2,5 µl/h) in die *Scala tympani* infundiert. Die Anzahl der überlebenden Neurone des Spiralganglions wurde durch die NT-3-Applikation auf 90% (von 14-24% bei den unbehandelten Kontrolltieren) erhöht. Die Anzahl der Neurone im BDNF-behandelten Spiralganglion betrug im Vergleich zu gesunden Tieren 78%.

Später wurde gezeigt, daß auch geringere Dosierung von NT-3 (62 µg/ml, 5 µl/h) mit 300 mM Amikacin-Lösung in der Pumpe das Überleben der Neurone förderte (Ernfors et al.,

1996). Der Zusatz von NT-3 zu Amikacin hat die Anzahl der Neurone im Spiralganglion von 14 % auf 94% (verglichen mit unbehandelten Ohren) erhöht.

In Meerschweinchen wurden NT-3 oder BDNF (50 ng/ml, 0,5 µl/h) 7 - 21 Tage nach der Kanamycin- und Ethakrynsäure-Injektion in die *Scala tympani* appliziert (Miller et al., 1997). Im Vergleich zur Kontrolle ohne Neurotrophine erhöhte die NT-3 - Behandlung die Anzahl der Neurone im Spiralganglion um 23%, die BDNF-Behandlung um 50%. In einem anderen Versuch wurde ein leichter ototoxischer Schaden durch Injektion von 5 x 400 mg/kg Kanamycin gesetzt (Ruan et al., 1999). Gleichzeitig wurde auch eine intraskaläre Applikation von NT-3 oder BDNF (0,25 µl/h, 100 µg/ml) gestartet. Der histologische Verlust der Haarzellen war an den mit NT-3 behandelten Ohren geringer, als in der BDNF- oder Kontrollgruppe.

Auch GDNF unterstützte das Überleben der Neurone des Spiralganglions während der Inkubation im Zellkulturmedium (Pirvola et al., 1996). Nach einem akustischen Schaden verminderte die intraskaläre zweiwöchige Infusion von 72 ng/h GDNF Verluste der Neurone im Spiralganglion von 67 % (bei den mit künstlicher Perilymphe behandelten Kontrolltieren) auf 1% (Ylikoski et al., 1998).

4.5.2.3. Physiologische Untersuchungen

Der Effekt einer einmaligen Applikation von GDNF auf ein akustisches Trauma wurde *in vivo* am Merschweinchen untersucht. Unmittelbar vor oder zwei Stunden nach dem akustischen Trauma wurde GDNF (100 µl, 0,2 mg/ml) an das runde Fenster der Cochlea appliziert. Vor dem Hörschaden und vier Wochen danach wurden auditorische Hirnstammpotentiale (auditory brainstem responses, **ABR**) gemessen. Die mit GDNF behandelten Ohren hatten einen um 9 dB (von 33 bis 24 dB) geringeren Schwellenverlust, als die mit künstlicher Perilymphe behandelten Ohren der Kontrolltiere. Wurde GDNF vier oder sechs Stunden nach dem Trauma gegeben, konnte keine Schutzwirkung durch GDNF erzielt werden (Keithley et al., 1998).

In einem weiteren Experiment wurden virale Vektoren, die das GDNF-Gen enthielten, in die *Scala tympani* gespritzt und das Tier anschließend mit Kanamycin und Ethakrynsäure vertäubt. Die ABR-Schwellenverluste wurden durch diese Behandlung bei 4 und 16 kHz, jedoch nicht bei 8 kHz vermindert (Yagi et al., 1999). Das zusätzlich produzierte GDNF verminderte signifikant die ABR-Schwellenverluste durch Gentamicin (Suzuki et al., 2000).

Spätere Versuche dieser Arbeitsgruppe zeigten, daß die Produkte der viral transduzierten DNA auch in der kontralateralen Cochlea gefunden wurden. Es wird spekuliert, daß der Austausch der Viren oder Substanzen durch den *Ductus cochlearis* und die Zerebrospinalflüssigkeit erfolgt, aber nicht durch die Blutbahn (Stöver et al., 2000b). Diese Vermutung wird auch von Shoji (et al., 2000) unterstützt. In seinem Experiment wurden auch konzentrationsabhängige kontralaterale Wirkungen einseitiger intracochleären Applikation von GDNF gezeigt. Dies betraf sowohl die protektiven Effekte gegen ein akustisches Trauma, als auch die Verstärkung der Schwellenverluste durch die hohe GDNF-Dosis.

Auch Ciliary neurotrophic factor (CNTF) wurde als Protektivum gegen Hörschäden durch chronische Applikation von Gentamicin (80 mg/kg im., 30 Tage) eingesetzt. Dazu wurde CNTF den Tieren 0,44 mg/kg subkutan nach jeder Gentamicin-Applikation 30 Tage lang injiziert. Die mittleren ABR-Schwellenverluste bei den CNTF-behandelten Tieren betragen 2 dB, die nicht mit CNTF behandelten Kontrolltiere wiesen um 9 dB stärkere Schwellenverluste auf (He et al., 1996).

5. Vorhaben

Im vorangehenden Kapitel wurde beschrieben, welche physiologischen Experimente zum Schutz des Innenohres vor ototoxischer und akustischer Hörschädigung bereits durchgeführt worden sind. Besonders viel wurde mit GDNF experimentiert. Das Ziel dieser Studie war, zu untersuchen, ob auch NT-3 eine protektive Wirkung auf Hörverluste haben kann.

Die Aminoglykoside schädigen primär die Haarzellen des Corti'schen Organs (vorwiegend basal in der Cochlea) und lösen eine Degeneration der Neurone im Spiralganglion aus (Spoendlin, 1971; Sone et al., 1998). Von den bekannten neurotrophen Faktoren haben GDNF (Stöver et al., 2000a) und NT-3 (Malgrange et al., 1998) ihre Rezeptoren in den Haarzellen des Corti'schen Organs auch im adulten Stadium. Diese beiden Rezeptoren wurden auch im Spiralganglion und in der *Stria vascularis* gefunden.

NT-3 reguliert und ermöglicht in der Ontogenese eine Innervierung des Corti'schen Organs vorwiegend in der Basis der Cochlea (Ernfors et al., 1995) – da, wo die Verluste durch Aminoglykoside am stärksten sind. Wenn die Verluste der Haarzellen durch allgemein gestörten Stoffwechsel und unterbundene Produktion von NT-3 zustande kommen, könnte der extern gegebene NT-3 eine Überbrückung bieten oder stimulierende und schützende

Wirkung ausüben. Die trkC-Rezeptoren in Neuronen des Spiralganglions und in der *Stria vascularis* ermöglicht Protektion gegen ototoxische Schäden auch auf diese den Rezeptor exprimierende Strukturen auszuüben.

Für vorliegende Experimente wurde ein Tiermodell entwickelt. An ihm konnten sehr starke hochfrequente Hörverluste erzeugt werden. Gleichzeitig blieben die Hörschwellen bei tieferen Frequenzen wenig beeinträchtigt. Bei gleichzeitiger Anwesenheit der stark, schwach und nicht geschädigter Schwellenbereiche konnte ein Otoprotektivum vollwertig getestet werden. An den Veränderungen der gesunden Bereiche kann ein eventueller Schaden oder positiv stimulierende Wirkung (eine Erniedrigung der Hörschwellen in der gesunden Cochlea) festgestellt werden. Die schwach und stark geschädigten Schwellenbereiche ermöglichen festzustellen, bei welcher Stärke oder Art des Schadens (Verlust der äußeren oder aller Haarzellen) der Wachstumsfaktor protektiv wirkt.

Nach erfolgreicher Fertigstellung eines Modells zur reproduzierbaren partiellen Hörschädigung wurden Experimente mit Wachstumsfaktoren begonnen. Nachdem ein Applikationssystem für Neurotrophine an Meerschweinchen getestet worden war, konnten die *in vivo* Versuche begonnen und die Wirkung der Wachstumsfaktoren auf die gesetzten Hörschäden untersucht werden.

Material und Methoden

1. Tiere und OP-Technik

Für die Versuche wurden bunte weibliche Meerschweinchen (BFA, Charles River Deutschland) verwendet. Die Meerschweinchen wurden zu viert in Käfigen gehalten, Futter und Wasser standen uneingeschränkt zur Verfügung. Das mittlere Gewicht der Tiere betrug 420 g (± 120 g). Vor Experimentbeginn wurden die Tiere zur Akklimatisation zwei Wochen im Tierstall gehalten. Zu Beginn aller Experimente wurden den Meerschweinchen Elektroden zur Messung des Summenaktionspotentials (CAP-Elektroden) implantiert.

1.1. Narkose

Fünf Minuten vor der Operation wurde den Tieren intraperitoneal (i.p.) Atropin 0,2 mg/kg Körpergewicht (KG, Atropinsulfat Braun[®] 0,5 mg, B. Braun Melsungen AG) injiziert. Atropin, ein Parasympatholytikum, verminderte die Schleim- und Speichelproduktion und dadurch auch die Erstickungsgefahr, z.B. durch Verschleimung der Bronchien.

Die Narkosemischung für Meerschweinchen bestand aus zwei Wirkstoffen: Ketamin (Ketavet[®], Pharmacia&Upjohn, Ketaminhydrochlorid 100 mg/ml,) und Xylazin (Rompun[®] 2%, BayerVital, Xylazinhydrochlorid 20 mg/ml). Die Mischung und das Volumen wurden so gewählt, daß die Dosis von Ketamin 80 mg/kg KG und Xylasin 8 mg/kg KG betrug. Die Narkosemischung wurde i.p. gegeben.

Das Tier wurde so bis zu 1 ½ Stunden in Narkose gehalten. Die Narkosetiefe wurde regelmäßig während der Operationen durch den Fußreflex kontrolliert. Bei einer nicht ausreichender Narkosetiefe wurden 10% der Anfangsdosis intramuskulär (i.m.) in den Hinterschenkel zusätzlich gegeben. Bei den Implantationen der Elektroden oder der Pumpen wurden bereits am Anfang 110% der gewöhnlichen Narkose-Dosis gegeben.

1.2. Operation

Die narkotisierten Tiere wurden am Scheitel, Nacken, Hals und hinter den Ohrmuscheln rasiert und auf den OP-Tisch gebracht. Sie lagen auf einer elektrischen Heizmatte, die die Körpertemperatur der Versuchstiere auf etwa 37°C hielt. Die rasierten Hautflächen wurden mit einer Jodlösung (Braunol[®] 2000, B. Braun Melsungen AG, 75 mg/ml Polyvidon-Iod) desinfiziert.

In den ersten Operationen waren die Versuchstiere zur laufenden Kontrolle an einen akustischen EKG-Monitor angeschlossen. Berührungen der Hände oder der OP-Instrumente mit dem Tier führten jedoch zu starken Störungen des elektrischen Signals. Deshalb wurde bei weiteren OPs auf die EKG-Überwachung verzichtet, die Kontrolle des allgemeinen Zustandes erfolgte optisch.

1.2.1. Freilegen und Öffnen der Bulla

Als erstes wurde ein kurzer Sagittalschnitt vom Nacken nach rostral gelegt. Der Schnitt wurde mit einer Schere nach vorn bis 2 mm an die Augenhöhe verlängert. Ab dem kaudalen Ende des Sagittalschnittes wurden links und rechts zwei weitere Schnitte schräg nach hinten (Richtung hinter die Ohrmuschel) gelegt. Die Hautlappen wurden nach lateral (vom Sagittalschnitt) stumpf abpräpariert, so daß die Bulla frei zugänglich wurde.

Ein Teil der Scheitelfläche des Schädels (ca. 1 cm²), welches vor den Nackenmuskeln nach rostral liegt, wurde mit einem scharfen Löffel von der Knochenhaut befreit. Die Halsmuskeln, die am Schädel verankert sind, wurden über den Bullae direkt hinter den Ohrmuscheln mit einer kleinen spitzen Schere durchgetrennt. Die Bullaoberfläche wurde mit dem scharfen Löffel gereinigt und mit spitzem Skalpell eröffnet. Die Öffnung konnte bei Bedarf mit einer anatomischen Pinzette erweitert werden.

1.2.2. Implantation der CAP-Elektroden

Durch die Öffnung der Bulla war der seitliche Bereich des runden Fensters sichtbar. Von oben und hinten wurde die Sicht durch eine Knochenleiste begrenzt, die direkt am runden Fenster ventral anfang und an der Bulladecke dorsal endete. An diese Knochenleiste wurde der abisolierte Haken einer isolierten CAP-Elektrode eingehängt. Als Elektrode wurde Golddraht (ø 0,125 mm mit einer Poly-tetra-fluor-ethylen, **PTFE**, Isolierung) verwendet. Gold, als inertes edles Metall, konnte über längere Zeit im Körper bleiben, ohne zu korrodieren und eine Gewebereaktion auszulösen.

Die Elektrode wurde mit einem Tropfen Gewebekleber (Histoacryl®) am Bullarand fixiert. Endgültig wurde die Elektrode mit Paladur® (zweikomponentiger Kaltpolymerisations-Kunststoff) am Schädelknochen befestigt, mit dem auch die Öffnung der Bulla verschlossen wurde (s. Abbildung 2).

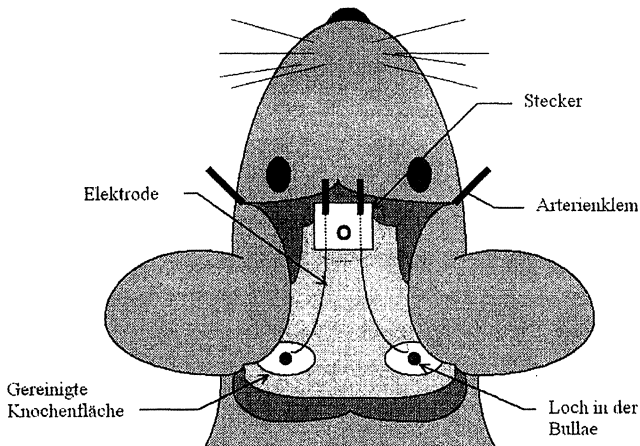


Abbildung 2: Kopf eines Meerschweinchens während Implantation der CAP-Elektroden. Der Scheitel ist freigelegt, die Haut wird mit Arterienklemmen gehalten. CAP-Elektroden wurden an die Knochenleiste am runden Fenster angehängt, aus den Bullae ausgeleitet und an den Stecker angelötet, der auf dem Schädel befestigt war. Danach wurde der Stecker mit Kunststoff übergossen (punktierte Linie um den Stecker), die Wunde vernäht.

1.2.3. Befestigung des Steckers

Nachdem die Elektroden auf beiden Seiten gelegt und fixiert waren, wurde die vorher am Scheitel von der Knochenhaut befreite Knochenoberfläche mit 70%-igem Ethanol gereinigt. An der höchsten Stelle des Schädels, neben der Sagittalnaht, wurde der Schädel trepaniert. In diesem Bohrloch fixierte schließlich eine Edelstahlschraube den Stecker. Die aus den Bullae kommenden Goldelektroden wurden unter den Muskeln zum Stecker durchgeführt und mit ihm verlötet.

Der Stecker wurde anschließend samt den Lötstellen der Goldelektroden mit Paladur® übergossen. Dadurch wurde elektrische Isolation und eine stabile Befestigung auf dem Knochen erlangt. Am besten haftete Paladur® auf trockener Knochenoberfläche.

Nach ersten Versuchen zeigte sich, daß die freiliegende Knochenoberfläche im Laufe der Zeit degenerative Veränderungen aufwies. Dies geschah durch bakterielle Einwirkung. Deswegen wurde die rostral vom Stecker liegende offene Knochenoberfläche durch eine dünne Schicht Paladur® geschützt.

1.2.4. Zunähen und Versorgung der Tiere nach der Operation

Nach Aushärtung des Kunststoffes wurde die gesamte Wundoberfläche mit Ringer-Lösung gespült. Die zwei seitlich abpräparierten Hautlappen wurden auf die Wunde gelegt und mit einer Dreiecksnaht an die Hautpartie des Nackens angenäht. Die Schnitte von der Dreiecksnaht zur Peripherie wurden mit mehreren unterbrochenen Nähten geschlossen.

Nähte und Wundränder wurden anschließend mit Betaisodona® (Polyvidon-Iodsalbe, Mundipharma GmbH, Limburg) beschichtet, was eine Infektion verhinderte. Am Ende der Operation wurde dem Tier zur Kompensation des Flüssigkeitsverlustes eine Mischung aus Ringerlösung (10 ml/kg KG) und 5% Glucoselösung (10 ml/kg KG) i.p. injiziert.

In der Aufwachphase verhinderte eine Infrarotlampe die Unterkühlung, bis der Muskeltonus sich wieder erholte und die Tiere in den Tierstall zurückgebracht wurden.

2. Methode der experimentellen Hörschädigung

2.1. Anforderungen an die Methode

An die Ertaubungsmethode, mit der später gearbeitet werden sollte, wurden folgende Ansprüche gestellt:

1. der Hörverlust sollte partiell sein.
2. das Tier sollte minimal belastet werden.
3. die Behandlungszeit mußte kurz bleiben.

Die etablierte Standardmethode zum Erzeugen eines totalen Hörverlustes ist eine Kombination aus 400 mg/kg Kanamycin i.p. und 40 mg/kg Ethakrynsäure i.v. (West et al., 1973). Ziel war es jedoch Dosierung und Applikationsart so zu wählen, daß der Hörschaden nur partiell gesetzt wird (maximal bei höheren Frequenzen, und minimal bei tieferen).

2.2. Dosierungen

Die von West und Mitarbeitern (1973) vorgeschlagene Dosierung von Kanamycin (400 mg/kg KG im.) und Ethakrynsäure (40 mg/kg KG i.v.) wurde in unseren Versuchen als Basis

genommen. Da diese Dosierung bereits eine maximal mögliche Wirkung hatte, wurden die Dosierungen beider Stoffe in mehreren Stufen verringert.

Kombinationen von Kanamycin und Ethacrynsäure.

		Kanamycin mg/kg		
		133	266	400
Ethakrynsäure, mg/kg	40	N=3	N=3	N=5
	30	N=8	N=9	N=7
	20	N=2	N=3	N=3
	0	N=4	N=3	N=3

Abbildung 3. Zwölf Kombinationen von Kanamycin und Ethakrynsäure, die in den Versuchen getestet wurden. Jedes Kästchen bedeutet eine Kombination, als „N“ wird die Anzahl der Tiere bezeichnet, die mit dieser Kombination behandelt wurden.

Insgesamt wurden zwölf Kombinationen aus drei Kanamycin-Dosierungen (400, 266 und 133 mg/kg) und vier Ethakrynsäure-Dosierungen (40, 30, 20, 0 mg/kg) getestet (s. Abbildung 3). Im Vergleich zur Standardmethode wurde aber von uns eine entscheidende Änderung vorgenommen: nicht nur Ethakrynsäure, sondern auch Kanamycin wurden i.v. appliziert. Die intravenöse Infusion von Kanamycin sollte die verzögerte Resorption aus dem Intraperitonealraum umgehen und die Bioverfügbarkeit der Substanz erhöhen. Neben einem exakten Plasmaspiegel lagen die Vorteile der Methode vor allem in der Reduktion der zum Setzen des Hörschadens notwendigen Dosis und dadurch in der Verringerung der allgemeinen Belastung des Tieres.

Um die Volumina der Infusionslösungen zu minimieren, wurde die Konzentration der Wirkstoffe hoch gehalten. Kanamycin löste sich in Wasser zu 100 mg/ml. Ethakrynsäure löst sich im Wasser nur in geringerer Konzentration, da die Substanz selbst die Lösung ansäuert und so die eigene Auflösung verhindert. Um Ausfäll der Substanzen beim Zusammenmischen der Lösungen zu vermeiden, sollten Kanamycin und Ethakrynsäure im identischen Lösungsmittel gelöst werden.

Aus diesem Grund wurde ein 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) als Lösungsmittel gewählt. Für die i.v. Infusion wurden folgende Lösungen eingesetzt:

- Kanamycin (Sigma Chemicals Co., St. Louis) 100 mg/ml
- Ethakrynsäure (Sigma Chemicals Co., St. Louis) 10 mg/ml

2.3. Intravenöse Infusion

Die intravenöse Infusion beim Meerschweinchen bringt einige methodische Schwierigkeiten.

- Die Venen dieser Tiere sind unter der Hautoberfläche nicht zu sehen und so mit einer Nadel nicht sicher erreichbar. Um eine Vene zu kanülieren, mußte deshalb das Tier narkotisiert und das Blutgefäß freigelegt werden.
- Die Blutgefäße sind bei Meerschweinchen außerordentlich dünn. Die Gefäßwände platzen selbst beim Einführen der dünnsten Kanülen (\varnothing 0,4 mm, „grau“) leicht.

Nach einer Beratung durch Dr. Sandoz (Hoechst AG, Frankfurt am Main) wurden für die i.v. Infusion Katheter aus Polyethylen (PE) eingesetzt (\varnothing außen 0,5 mm, innen 0,2 mm). Das narkotisierte Tier wurde für die Infusion auf den Rücken gelegt und am Hals ein Hautschnitt auf der Höhe des hinteren Unterkieferrandes ca. 1 cm nach kaudal gelegt. Mit einer stumpfen Schere wurde die *Vena jugularis interna* auf einer Länge von ca. 5 mm von Muskel und Bindegewebe freigelegt.

2.3.1. Legen der Kanüle

Unter das freigelegte Blutgefäß wurde ein Dreieckstupfer gelegt, der die Vene etwas spannte und von der Oberfläche abhob. Durch den entstandenen Druck auf die Vene wurde der Blutstrom im Blutgefäß unterbrochen, was eine Blutung bei der weiteren Sektion verhinderte. Um die freigelegte Vene wurden zwei Nahtfäden einmal umwickelt und mit einem einfachen Knoten gebunden, jedoch ohne fest zuziehen. Schließlich wurde das Gefäß

mit einer Mikroschere möglichst rostral zwischen den beiden um die Vene gelegten Fäden schräg von rostral nach apikal angeschnitten.

In die geschnittene Öffnung der Vene wurde der PE-Katheter gelegt und ca. 1 cm von der Eintrittsstelle nach kaudal eingeführt. Der PE-Katheter wurde schließlich unterhalb der Eintrittsstelle mit dem kaudal an die Vene gelegten Faden an Gefäß fixiert. Die Schnürkraft des Fadens behinderte jedoch nicht den Fluß im Katheter. Der zweite, um die Vene gebundene Faden verhinderte die Blutung der Vene aus rostraler Richtung. Das biegsame Polyethylen paßte sich der Richtung des Blutgefäßes an und konnte so über mehrere Stunden ohne Komplikationen im Gefäß bleiben.

2.3.2. Technik für die Infusion

Für die i.v. Infusion kleiner Volumina mehrerer Lösungen nacheinander durch denselben venösen Zugang wurde ein spezielles Infusionssystem entwickelt (s. Abbildung 4).

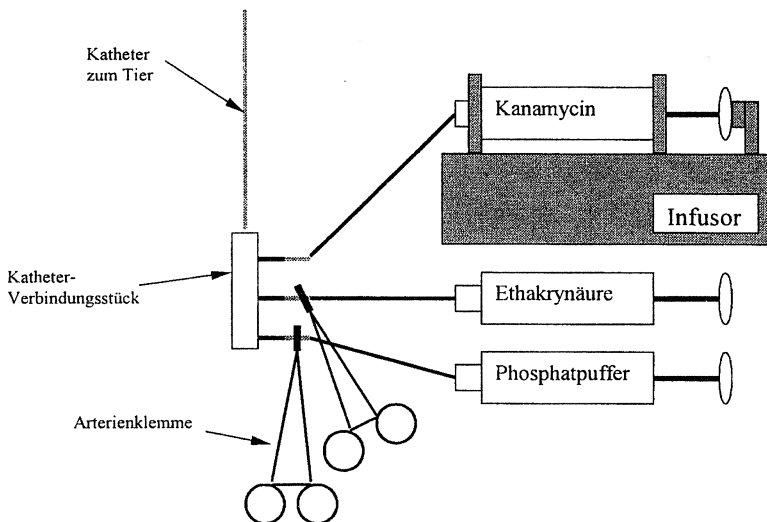


Abbildung 4. Das Infusionssystem während der Infusion von Kanamycin. Infusor bewegt die Spritze mit Kanamycin. Das Fließen von Ethakrynsäure und Phosphatpuffer wird durch Arterienklemmen unterbunden. Die Lösungen aus dem Katheter-Verbindungsstück fließen in die Vene des Versuchstieres.

An die Eingänge einer mehrkanäligen Kupplung waren 10 ml-Spritzen mit Lösungen von Kanamycin, Ethakrynsäure oder Phosphatpuffer angeschlossen. Die Verbindungskatheter zwischen den Spritzen und dem Kupplungskörper waren mit Arterienklemmen verschlossen. Zur Infusion wurde eine Spritze mit entsprechender Lösung in den Perfusor (B.Braun Melsungen AG) eingelegt, die Flußrate eingestellt und die Arterienklemme aufgemacht. An den Ausgang der Kupplung war der PE-Katheter angeschlossen, der die Lösung in die Vene leitete.

Die Geschwindigkeit des Perfusors wurde so eingestellt, daß das notwendige Volumen jeder Lösung in je 6 Minuten injiziert wurde. Nachdem eine Lösung appliziert war, wurde der Perfusor angehalten, der Spritzen-Katheter aber erst zwei Minuten später abgeklemmt. Die Zeit dazwischen diente dem Auslaufen der restlichen Lösung aus dem System.

2.3.3. Infusiosabfolge

Wenn der Katheter in die Vene eingeführt und die Fäden fixiert waren, wurde die Spritze mit Phosphatpuffer kurz aspiriert, um den richtigen Sitz des Katheters in der Vene zu überprüfen. Aspiriertes Blut in dem Katheter deutete auf gute Lage und funktionierenden Durchfluß.

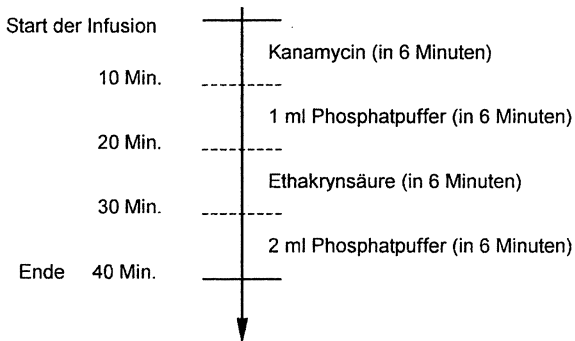


Abbildung 5. Zeitschema der i.v.-Infusion. Die Zeitachse läuft vertikal nach unten. Auf der linken Seite sind die Zeitabschnitte in Minuten, rechts sind die Infusionslösungen in den Zeitabschnitten angegeben. Jede Infusion einer Etappe dauerte unabhängig von der Menge der Infusionslösung sechs Minuten.

Zuerst wurde die Kanamycinlösung innerhalb von 6 Minuten injiziert. Zwei Minuten danach wurde der Verbindungskatheter der Kanamycin-Spritze abgeklemmt und die Spritze mit Phosphatpuffer in den Infusor geladen. 10 Minuten nach Beginn der Kanamycin – Infusion wurde 1 ml Phosphatpuffer infundiert. Nach einer weiteren Pause wurde die Infusion von Ethakrynsäure zum Zeitpunkt 20 Minuten (seit Beginn der Kanamycin-Infusion) gestartet. Zuletzt, zum Zeitpunkt 30 Minuten, wurden 2 ml Phosphatpuffer infundiert (s. Abbildung 5). Zwei Minuten nach dem Ende der zweiten Phosphatpuffer-Infusion wurde der PE-Infusionskatheter aus der Vene gezogen und die Vene unterhalb der angeschnittenen Stelle mit dem Faden abgebunden.

Das Totvolumen des Systems von der Spritze, über den Verbindungskatheter und die Kupplung bis zur Spitze des Infusionskatheters betrug etwa 0,1 ml. Nach Kanamycin und Ethakrynsäure wurde Phosphatpuffer injiziert. Diese Pufferlösung, in der auch die Wirksubstanzen gelöst waren, diente als Spülmittel. Es ließ die Ototoxika-Lösungen aus dem Totvolumen des Systems in die Vene abfließen. Man kann also davon ausgehen, daß das ganze Volumen der Wirkstofflösungen am Ende jeder Infusion vollständig in die Vene entleert wurde.

3. Messung der Summenaktionspotentiale des Hörnervs

3.1. Ablauf

3.1.1. Tiere ohne Pumpe

Die Tiere mit implantierten CAP-Elektroden (ohne Pumpen) wurden nach der Operation eine Woche zur Erholung im Tierstall gehalten. Nach dieser Woche wurden die CAP-Schwellen gemessen, die bei der weiteren Auswertung als Kontrolle dienten. Eine Woche nach der Kontrollmessung erfolgte dann die i.v. Infusion von Kanamycin und Ethakrynsäure.

3.1.2. Tiere mit Pumpe

In späteren Versuchen wurden den Tieren während der Implantation nicht nur CAP-Elektroden, sondern auch Pumpen zur Infusion von Wachstumsfaktoren implantiert (s. auch Kapitel 4.5.1. Implantation der ALZET-Pumpen). Bei den Tieren mit Pumpe wurde die Bestimmung der CAP-Kontrollschwellen am vierten Tag nach der Implantation durchgeführt. Direkt im Anschluß an diese Messung wurde Kanamycin und Ethakrynsäure i.v. infundiert. Am 2., 4., 8., 16. und 32. Tag nach der Infusion wurden die Hörschwellen bei allen Tieren gemessen.

3.2. Behandlung der Tiere vor der Messung

Für jede Messung der CAP - Schwellen wurden die Tiere mit der auch für Operation verwendeten Narkosemischung (80 mg/kg Ketamin und 8 mg/kg Xylasin) sediert. Vor Beginn der Messung wurden unter dem OP-Mikroskop Mittelohr und Trommelfell optisch inspiziert. Cerumen oder andere Verunreinigungen wurden aus dem Gehörgang entfernt.

Ein trübes und gerötetes Trommelfell, welches auf eine Mittelohrentzündung hindeutete, wurde im Versuchsprotokoll vermerkt. Hörverluste, die vor der Infusion der Ototoxika oder nach dem vierten Tag nach der Infusion der Ototoxika auftraten, waren nicht auf die Ertaubung durch Kanamycin und Ethakrynsäure zurückzuführen. Bei stärkeren unerwarteten und plötzlich eingetretenen Hörverlusten konnte als einziger Grund eine Entzündung des Hörapparates in Frage kommen. In solchen Fällen wurden die Daten dieser Messung nicht in die Gesamtergebnisse einbezogen.

3.3. Durchführung der CAP-Schwellenmessung

Unter die Nackenhaut wurde eine Kanüle gelegt und durch sie ein Silberdraht gezogen. Der Silberdraht diente während der CAP-Messung als indifferente Elektrode. Sie und die CAP-Elektrode am Kopfstecker wurden mit dem Vorverstärker verbunden.

Nachdem die Elektroden angeschlossen und das Mittelohr kontrolliert waren, wurde ein Geräusch (z.B. Pfeifton) gegeben. Bei richtigem Anschluß der Elektroden wurden so Mikrofonpotentiale des angeschlossenen Ohres auf dem Bildschirm des Oszilloskopes registriert. Der Lautsprecher wurde unter mikroskopischer Kontrolle in den Gehörgang eingeführt. Die Messung erfolgte in einer akustisch und elektrisch abgeschirmten Kammer.

3.4. Meßeinrichtung

Die Messung der CAPs erfolgte durch eine computergesteuerte Elektronik. Die ganze Anlage bestand aus zwei funktionellen Einheiten, die auch technisch voneinander unabhängig waren.

- Der erste Teil (Reizkette) hatte die Funktion, akustische Signale von bestimmter Frequenz, Intensität und Länge herzustellen und dem Ohr zu präsentieren.
- Die durch den akustischen Reiz erzeugte Antwort, die in Form von CAPs abgeleitet wurde, wurde von dem zweiten Teil (Aufnahmekette) verstärkt, gefiltert zur Computereinheit geleitet, dort ausgewertet, dargestellt und gespeichert.

Da beide Teile der Anlage und die Computereinheit technisch und funktionell unabhängig

voneinander funktionieren, werden sie separat in einzelnen Kapiteln beschrieben. Anschließend werden die Meßprinzipien dargestellt.

3.4.1. Reizkette

Als akustische Reize zum Auslösen der CAPs wurden Tonpulse von 2/3 Oktavenbreite mit einer gaussförmigen Intensitätsumhüllenden benutzt. Hörschwellen wurden in zwei Frequenzschritten pro Oktave zwischen 0,25 und 64 kHz gemessen. Die elektrischen „Ausgangspulse“ zum Erzeugen der akustischen Signale wurden in Frequenz und Dauer durch den Rechner hergestellt. Er erzeugte sie digital und wandelte durch internen D/A-Wandler in analoge Signale um.

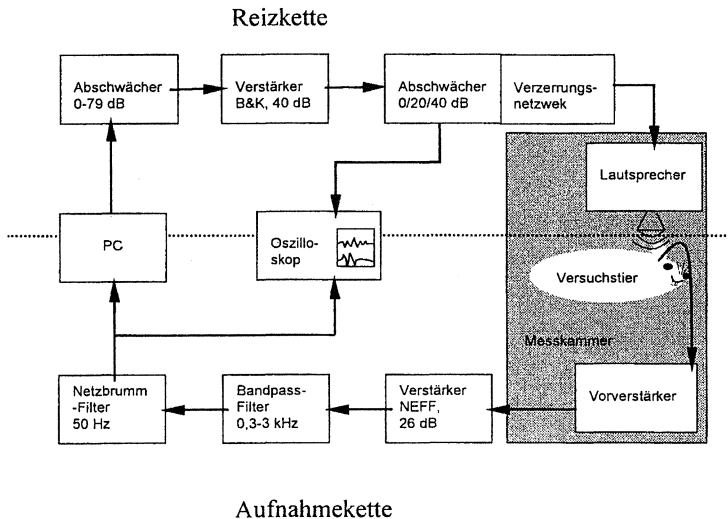


Abbildung 6. Die Reizkette (oberhalb der punktierten Linie) produziert einen Akustischen Reiz, der am Ohr des Versuchstiers gegeben wird. Die neuronale Antwort auf den Reiz wird durch die Aufnahmekette (unterhalb der punktierten Linie dargestellt) verstärkt, gefiltert und zur Verarbeitung zur PC-Einheit geleitet.

Die Amplitude der analogen elektrischen Reizsignale wurde von einem Abschwächer in 1 dB-Schritten von 0 bis 79 dB variiert (s. Abbildung 6). Die in ihrer Amplitude genau abgeschwächten Reize wurden durch einen Verstärker (Brüel & Kjær, Typ: Power Amplifier 2713) um 40 dB (100-fach) verstärkt.

Das Signal wurde von einem Verzerrungsnetzwerk vorverzerrt, um die Übertragungseigenschaften des als Lautsprechers verwendeten Kondensator-Mikrophons (Brüel & Kjær, Typ: 4166, \varnothing ½ Zoll) zu korrigieren. In dem Verzerrungsnetzwerk war ein Abschwächer eingebaut, der das Signal bei Bedarf um 0, 20 oder 40 dB abschwächte und zum Lautsprecher leitete.

3.4.2. Messkammer

Die Messkammer bestand aus einem doppelwandigen Gehäuse, von innen mit mehreren Schichten von schalldämpfendem Material ausgekleidet. Das Gehäuse stand auf einem Rahmen vom Boden abgehoben, was die Übertragung der Bodenschwingungen zum Gehäuse minderte. So war maximale Schallisolation des Kammerinneren von Umgebungsgeräuschen gewährleistet.

Aus der Kammer konnte ein Schiebeboden ausgefahren werden. Auf dem Schiebeboden waren der Lautsprecher und ein Liegeplatz für das Versuchstier, mit integrierter elektrischer Heizmatte installiert. Waren die Elektroden des Tieres an dem Vorverstärker angeschlossen und der Trichter des Lautsprechers in den Gehörgang eingeführt, wurde der Schiebeboden in die Kammer gefahren und arretiert. Nach dem Schließen der Tür wurde die Messung gestartet.

3.4.3. Aufnahmekette

Die Aufnahme und erste Verarbeitung vom CAP-Signal erfolgte durch die Aufnahmekette. Die abgeleiteten Potentiale wurden zur Kontrolle nach jeder Verarbeitungsstufe auf dem Oszilloskop dargestellt.

Das erste Gerät in der Aufnahmekette war ein in der Messkammer sich befindender Vorverstärker (konzipiert und gebaut im Elektroniklabor des Institutes für Physiologie von Herrn Th. Wulf). Mit ihm waren die indifferente Silberelektrode vom Nacken des Meerschweinchens und die Goldelektrode vom runden Fenster verbunden. Der Vorverstärker verstärkte die abgeleiteten Potentiale 100 mal (um 40 dB). Die Signalverstärkung bereits in der Meßkammer hatte den Vorteil, nur die Signalamplitude und nicht den Rausch- oder Brummanteil zu vergrößern. Längere elektrische Leitungen außerhalb der elektromagnetisch abgeschirmten Kammer fangen die elektromagnetischen Störungen der Umgebung ein. Eine Verstärkung außerhalb der Kammer erhöht demnach auch die Amplitude des Rauschens und verschlechtert so das Verhältnis vom CAP-Signal zum Rauschen.

Vom Vorverstärker in der Meßkammer wurde das Signal zum zweiten Verstärker (NEFF, Typ: 122 D. C. Amplifier) geleitet. Die um das 20-fache (26 dB) verstärkte CAP-Amplitude ermöglichte eine genauere Auflösung durch den AD-Wandler. Bei Bedarf konnte die Verstärkung zwischen 10fach bis 200fach variiert werden.

Nach dem NEFF-Verstärker wurde das Signal von einem Bandpass-Filter gefiltert (Frequency Devices, Typ 9002, Durchlassbereich war 0,3-3 kHz, Flankensteilheit 48 dB/Oktave).

Dem Ausgang des Bandpass-Filters war ein Netzbrumm-Filter (Quest Scientific, Hum Bug) nachgeschaltet. Dieser Filter minimierte das Rauschen vom Netz bei 50 Hz. Auf dem Oszilloskopen wurde die verstärkte und gefilterte CAP-Antwort kontrolliert.

Die zum PC geleiteten analogen CAP-Antwortpotentiale wurden durch den PC-internen AD-Wandler in ein digitales Signal übersetzt. Das digitale Signal wurde schließlich im PC rechnerisch verarbeitet und ausgewertet.

3.4.4. Computereinheit. Erste Verarbeitung zur Eliminierung der Mikrofonpotentiale

Die Mikrofonpotentiale haben eine sehr geringe Latenz. Die CAPs haben eine Verspätung gegenüber dem Reiz von etwa 1 ms. Wenn der Reiz aber länger dauert als die Latenzzeit der CAPs, überlappen sich beiden Funktionen zeitlich. In unseren Versuchen sollten CAPs gemessen werden, weshalb die Mikrofonpotentiale rechnerisch eliminiert wurden.

Die Reize wurden nie einzeln, sondern immer in Paaren ans Ohr gegeben. Der zweite Reiz war identisch mit dem ersten, aber invertiert. Auf diese Weise wurden zwar von beiden Reizen die gleichen CAPs erzeugt, die Mikrofonpotentiale waren aber bei gleicher Stärke und Verlauf von invertierter Polarität. Durch Addition beider Antwortpotentiale eliminierten sich die Mikrofonpotentiale, die nach den beiden Reizen erzeugt wurden, während die doppelte CAP-Antwort ausgewertet wurde.

3.5. Bestimmung der Hörschwellen

Die Hörschwellenmessungen hatten das Ziel, die Schwelle der CAPs auf 1 dB genau in zwei Schritten pro Oktave bei Trägerfrequenzen zwischen 0,25 und 64 kHz (bei insgesamt 17 Frequenzen) objektiv zu bestimmen.

Nach einem Reiz wurde die CAP-Antwort rechnerisch als überschwellig oder unterschwellig bewertet. Die Aussage, ob die Antwort über- oder unterschwellig ist, wurde getroffen, indem die maximalen Amplituden der aufgenommenen Potentiale in zwei

Zeitfenstern verglichen wurden. Das erste Zeitfenster war eine antwortfreie Zeit, in der die spontane Aktivität und das Rauschen gemessen wurden. Das zweite Zeitfenster wurde direkt nach dem Reiz aufgenommen und beinhaltete die Antwort auf den gegebenen Reiz.

War die maximale Potentialamplitude in dem zweiten (Antwort-) Zeitfenster größer als in dem ersten, wurde der Reiz als überschwellig definiert. Wenn die Amplitude im ersten Fenster größer oder gleich dem zweiten war, wurde der Reiz als unterschwellig bewertet. Da das Rauschen in beiden Fenstern eine zufällige Größe ist, war die Wahrscheinlichkeit einer positiven oder negativen Aussage auch bei fehlender Antwort gleich 50%.

Um einen konkreten Reiz sicherer als über- oder unterschwellig zu bewerten, wurde die Aussage in weiteren Schritten statistisch überprüft. Der gleiche Reiz wurde so oft wiederholt, bis die statistische Aussage mit einer 90%-igen Wahrscheinlichkeit als „richtig“ getroffen werden konnte. Dafür wurde ein statistisches Verfahren von Wald (Wald, 1947) benutzt.

Die Hörschwelle wurde mit einem Suchalgorithmus PEST (Taylor und Creelman, 1967) in der Modifikation von Smolders (1995) gesucht. Die Messung wurde bei 50 dB Abschwächung von der maximalen Signal-Amplitude angefangen. Ergab die Messung der ersten Intensität „überschwellig“, wurde die Reizintensität um 16 dB verkleinert, bei „unterschwellig“ um 16 dB verstärkt. Im Fall einer gleichen Aussage bei erster und zweiter Intensität wurde die Suchrichtung fortgesetzt, bis die Hörschwelle überschritten war und die Aussage sich änderte.

Bei Überschreitung der Hörschwelle wurde die Suchrichtung gewechselt: von Abschwächung zu Verstärkung oder umgekehrt. Die Schrittgröße wurde bei jeder Richtungsänderung halbiert: von 16 auf 8, 4, 2 und schließlich 1 dB. Wurde die Hörschwelle nach zwei Schritten in eine Richtung nicht erreicht, wurde die Schrittgröße verdoppelt. Änderte sich die Aussage bei einer Schrittgröße von 1 dB, wurde die Suche gestoppt und die letzte Reizintensität als Hörschwelle der gemessenen Frequenz definiert.

Wenn auch die maximale Intensität des Reizes keine meßbare Antwort bei einer Frequenz induzierte, wurde der maximal erzeugte Schalldruck bei dieser Frequenz durch das Programm als Hörschwelle festgesetzt.

3.6. Auswertung

Die oben beschriebene Hörschwellen - Suchroutine hatte als Bezug nicht die Schalldruckpegel des Lautsprechers, sondern die Intensitäts-Abschwächungen von der maximalen Signal-Amplitude des Systems. Deshalb mußten die Schalldruckpegel der

Hörschwellen bei der Datenauswertung in dB SPL umgerechnet werden.

Dafür wurde vor den Versuchen der Lautsprecher auf einen Schalldruck bekannter Intensität geeicht. Durch ein Pistonfon (Brüel & Kjær, Typ 4220) wurde Schalldruck einer bekannten Intensität bei 250 Hz erzeugt. Das durch ein Mikrophon aufgenommene Signal wurde bei dieser Frequenz in Volt am Spektralanalysator (Stanford Research Systems, Modell SR 760 FFT) gemessen und so der Übertragungsfaktor des Mikrophons bestimmt. Anschließend wurde der im Versuch eingesetzte Lautsprecher mit dem Mikrophon verbunden. Die durch den Ton des Lautsprechers im Mikrophon erzeugte Spannung wurde mit der Spannung verglichen, die der Schalldruck des Pistonfons erzeugte. Durch Vergleich der Spannung konnten die Schalldruckpegel errechnet werden, die der Lautsprecher erzeugte. Bei einer Verstärkung oder Abschwächung des elektrischen Reizes um einen bestimmten Faktor änderte sich die Intensität des akustischen Reizes um den gleichen Faktor auch.

3.6.1. Referenzhörschwelle

Vier Tage nach der Implantation der Elektroden und der Pumpe (am Tag 0) wurden die Referenzhörschwellen der Tiere gemessen. Direkt im Anschluß an diese Messung wurde den Meerschweinchen ein Hörschaden durch Infusion von Kanamycin und Ethakrynsäure gesetzt.

Die auf diese Weise hörgeschädigten Tiere wurden am 2., 4., 8., 16. und 32. Tag nach der Infusion der Ototoxika gemessen. In den Hörschädigungsversuchen wurde festgestellt, daß die Hörschwellen der mit Kanamycin und Ethakrynsäure behandelten Tiere sich sofort ändern, aber erst am vierten Tag nach der Infusion sich stabilisieren und weiter unverändert bleiben. Sollten die Hörschwellen eines Tieres oder einer Tiergruppe als eine Größe zusammengefaßt werden, wurden sie ab dem 4. bis zum 32. Tag gemittelt (der Tag 2 wurde nicht einbezogen).

4. Applikation der Wachstumsfaktoren

4.1. Möglichkeiten der Wachstumsfaktorapplikation

Unser Ziel war eine Verminderung von Innenohrschäden, deshalb sollten die Wachstumsfaktoren ihre Wirkung vor allem in der Cochlea entfalten. Zuerst wurden die Wachstumsfaktoren lokal am Wirkungsort appliziert. Es sollte die gezielte Wirkung bei minimalen Nebenwirkungen untersucht werden. Neben der intracochleären Infusion der Lösung wurde später auch extracochleäre Applikation realisiert.

4.1.1. Intracochleäre Applikation

Der einfachste Zugang zum Inneren der Cochlea führt über die Knochenschale der Cochlea in der Nähe des runden Fensters. Durch die trepanierte Öffnung wird ein Zugang in die *Scala tympani* der Cochlea ermöglicht. Dieser Zugang wurde in mehreren Versuchen mit intracochleärer Applikation benutzt, in denen die von Brown (et al., 1993) konzipierte Methode modifiziert eingesetzt wurde.

Direkt an der Cochleaschnecke konnte der Katheter nicht befestigt werden, vor allem wegen der geringen Dicke des Knochens. Deshalb wurde zuerst versucht, ein steifes Endstück des Katheters zu bauen und dieses am Rand der Bulla zu befestigen. Dafür eignete sich eine Metallkanüle am besten. Der zwischen dem Bullarand und der trepanierten Öffnung verlaufende Katheter blieb formstabil und behielt eine leichte Spannung, die das Ende des Katheters in der Öffnung der Cochlea fixierte.

Nach mehreren Versuchen stellte sich diese Methode als ungeeignet heraus. Neben häufigen Infektionen, die nicht nur den Bereich des Mittelohres betrafen, sondern auch das Innenohr, wurde ein Zuwachsen der *Scala tympani* mit Bindegewebe festgestellt. Das neu gebildete Gewebe wuchs von der trepanierten Stelle die *Scala tympani* nach apikal und auch in das Innere des Katheters hinein. Dadurch wurde der Katheter verstopft.

Es wurde vermutet, daß diese Reaktion hauptsächlich durch das Katheterendstück ausgelöst wurde. Bei den nächsten Versuchen wurde das Katheter-Endstück aus Polyethylen hergestellt. Das PE-Stück war elastisch und dadurch nachgiebig. Das in die trepanierte Öffnung gesteckte PE-Stück konnte unter leichter Spannung beliebig tief in die Cochlea eingeführt werden und dabei die Strukturen des Innenohres schädigen. Deshalb wurde in der Nähe der Spitze des PE-Stückes ein Tropfen Silikon gelegt, der den äußeren Durchmesser des Katheters erhöhte und zu tiefes Eindringen in die Cochlea verhinderte. Die Bindegewebs-Reaktion wurde auch in diesen Versuchen ausgelöst.

Zuletzt wurde für das Katheter-Endstück Teflon®-Schlauch aus Polytetrafluorethylen (PTFE) genommen. PTFE ist ein der chemisch inertesten organischen Stoffe und sollte keine Gewebsreaktion auslösen. Die Katheter, mit Silikontropfen 0,2 mm vom Ende versehen, wurden mehreren Tieren implantiert. Die Reaktion des Bindegewebes blieb aber auch bei diesen Versuchen nicht aus.

4.1.2. Extracochleäre Applikation

Für die extracochleären Endstücke der Katheter wurden PTFE-Schläuche verwendet. Sie

wurden in einer Flamme gezogen und auf die notwendige Länge geschnitten. Das Ende des Katheters wurde direkt über der Membran des runden Fensters plaziert. Um das Abfließen der aus dem Katheter ausgetretenen Lösung zu vermeiden, wurde ein Filz aus nicht resorbierbarem Material (Dakron®) nach dem Legen der CAP-Elektroden in die Knochennische über dem runden Fenster gestopft. Der Filz fing die aus dem Katheter austretende Flüssigkeit auf und benetzte die Membran des runden Fensters.

4.2. Pumpen für die Implantation

Parallel zu der Entwicklung der Katheter und ihrer Implantation wurden auch die implantierbaren Pumpen für die Applikation der Wachstumsfaktoren getestet.

Aus früheren Versuchen in unserer Arbeitsgruppe waren osmotische Mikropumpen der Firma ALZET bekannt. Der Nachteil der Pumpen ist, daß sie steril geliefert werden und bei Bedarf nicht mehr resterilisiert werden konnten. Ein weiterer Nachteil dieser Pumpen lag in ihrer einmaligen Verwendung. Das heißt, die Pumpen wurden befüllt, gestartet und liefen begrenzte Zeit. Am Ende der Laufzeit konnten sie nicht nachgefüllt, sondern mußten explantiert werden. Der Austausch solcher Pumpen war möglich, aber unter sterilen Bedingungen kompliziert. Deshalb wurde zuerst versucht, wiederbefüllbare Pumpen zu implantieren.

4.2.1. ESOX®

Die einzige uns bekannte wiederauffüllbare und frei käufliche Pumpe für Tierversuche war die ESOX-Pumpe. Sie konnte in einem Autoklaven bei 121°C mit Dampf sterilisiert werden. Die Geschwindigkeit dieser Pumpe wurde durch ein Polyimidröhrchen und den davor stehenden Polysulphonfilter begrenzt. Der Druck, der die Flüssigkeit aus der Pumpe trieb, wurde mechanisch beim Spritzen der Flüssigkeit in die Pumpe erzeugt und als Spannung einer Feder gespeichert.

In den ersten Versuchen mit der ESOX-Pumpe an den Tieren wurde Ethakrynsäurelösung getestet. Die Ethakrynsäure, die an das runde Fenster der Cochlea appliziert wurde, löste Hörverluste an der behandelten Seite im Laufe von drei Tagen aus. Die Infektionsgefahr war im Laufe von drei Versuchen gering.

Bei einer Beratung des Pumpenherstellers ergab sich, daß der Polysulphonfilter eine hohe, unspezifische Proteinaffinität besitzt und damit Proteine aus der Lösung (Albumin oder Wachstumsfaktor) adsorbierten kann. Adsorbierte Proteinmoleküle würden die Poren des

Filters entweder ganz verstopfen, oder deren Durchmesser erheblich verkleinern. Die damit einhergehende Verringerung der Fließgeschwindigkeit würde aber die Dosis des Wachstumsfaktors drastisch senken. Bei derart unkontrollierter Abgabe des Wachstumsfaktors wäre die Pumpe im geplanten Versuch ungeeignet.

4.2.2. MDS

Eine weitere Möglichkeit, proteinhaltige Lösungen kontrolliert und über längere Zeit ins Ohr zu applizieren bot das Mikrodosiersystem (MDS) aus der Tübinger HNO-Klinik (Lehner et al., 1998). Das MDS konnte über einen Port, der an ihn befestigt war, mehrmals gefüllt werden. Die Lösung im Reservoir wurde ohne zusätzlichen Druck gehalten. Durch eine Druckbetätigung des Pumpenkolben von außen durch die Haut wurde ein Bolus vom bestimmten Volumen mit hohem Druck aus der Pumpe abgegeben.

In den ersten Versuchen mit MDS, in denen auch Ethakrynsäure als Testsubstanz benutzt wurde, traten Sterilitätsprobleme auf. Das MDS konnte nicht autoklaviert werden. Die einzige Möglichkeit war eine Gassterilisation, die aber nur von außen sterilisierte. Eine innere Sterilisation gelang nur, indem das System mit Alkohol durchspült wurde. Durch diese Spülung wurden aber aus dem Kolben der Pumpe Schmierstoffe gelöst. Der Kolben klemmte oder funktionierte nicht mehr zuverlässig. Ein weiterer Nachteil des MDS war der Preis von ca. 7.000,- DM je Stück. Aus diesen Gründen war das MDS für unsere Versuche nicht geeignet.

4.2.3. ALZET®

Zuletzt wurden die osmotischen ALZET-Pumpen in den Versuchen mit Meerschweinchen getestet. Sie bestehen aus einer porösen Plastikschaale und einem Silikonreservoir, das mit Lösung gefüllt wird. Zwischen der Schale und dem Reservoir war eine osmotisch aktive Schicht. Die langsame Wasseraufnahme durch die Poren der Schale vergrößerte das Volumen dieser Schicht kontinuierlich und trieb die Lösung aus dem Reservoir nach außen. Die Pumpgeschwindigkeit wurde durch die Größe der Poren in der Plastikschaale bestimmt.

Nach Anwendung eines Chemotherapeutikums (Metronidazol) traten die Infektionen bei den Tieren mit implantierten Pumpen nur selten auf. Auch Versuche mit NT-3 *in vitro* bewiesen, daß die Pumpen in der Lage sind, die Wachstumsfaktoren in der gewünschten Konzentration über längere Zeit zuverlässig zu fördern. Die ALZET-Pumpen wurden

erfolgreich getestet und in weiteren Versuchen eingesetzt.

4.3. Pumpenkatheter

Für die NT-3 Applikation wurde das von Kingma (et al., 1992) aufgebaute und von Brown et al. (1993) modifizierte System als Basis genommen. Mit dieser Methode wurde die Lösung aus der Mikropumpe durch Polyurethankatheter und darauf aufgesetzte Teflonspitze ins Innenohr gefördert.

In unseren Experimenten wurde die Lösung an die Membran des runden Fensters appliziert. Für diese extracochleäre Applikation wurde auch der Katheter anders konzipiert. Die Teflonspitze des Katheters wurde verstärkt. Sie wurde aus einem 0,8 mm dicken PTFE-Röhrchen hergestellt. Der Polyurethanschlauch des Katheters, der immer noch standardmäßig eingesetzt wird, wurde durch ein Silikonschlauch ausgetauscht.

4.4. Applikationskontrolle

Es gibt mehrere Wachstumsfaktoren, die bereits *in vitro* getestet sind und eine protektive oder sogar regenerative Wirkung auf Innenohrstrukturen nach einem ototoxischen Schaden aufweisen (Übersicht bei Gao, 1998). Die Haarzellen besitzen aber nur Rezeptoren für NT-3 (Malgrange et al., 1998). Da unser Ziel vor allem Schutz der Haarzellen war, wurde in den *in vivo* Versuchen NT-3 eingesetzt. Der Versuchsplan war so aufgebaut, daß NT-3 zuerst *in vitro* auf Stabilität bei 37°C und auf Kompatibilität mit den Pumpen getestet wurde. Erst im zweiten Schritt wurde die Wirkung des Wachstumsfaktors an lebenden Tieren untersucht.

4.4.1. ELISA – Verfahren zur Konzentrationsbestimmung

Zur Untersuchung der Konzentrationen von NT-3 in den Lösungen wurde ein Immunoassay (ELISA) durchgeführt. Dafür gab es einen kommerziell käuflichen Kit (E_{max}-ELISA Kit von Promega). Durch diesen Test konnte die Konzentration des Faktors in der Lösung im Pikogrammbereich bestimmt werden.

Als Oberfläche für die ELISA-Tests wurden Polystyrenplatten mit 96 Vertiefungen (Wells) eingesetzt. Im ersten Schritt wurden in die Wells je 100 µl der Lösung von monoklonalem NT-3- Antikörper (anti-NT-3 mAb) gelöst in destilliertem Wasser gegeben. Die gefüllte Platte wurde über Nacht im Kühlschrank bei 4°C gehalten. In 16-20 Stunden hatten sich die Antikörper sedimentiert und am Boden hoher Proteinaffinität adsorbiert.

Am nächsten Tag wurden die ungebundenen Antikörper mit einer speziellen Spüllösung

(TBST) ausgewaschen und die Wells mit je 200 µl der Block & Sample Pufferlösung befüllt. Die Peptide der Pufferlösung adsorbierten an die proteinbindende Oberfläche der Wells flächendeckend. Dadurch wurde eine weitere Proteinbindung an die Welloberfläche im Laufe des Experimentes verhindert. Der erste Antikörper (anti-NT-3 mAb) stellte sicher, daß nur NT-3 aus der später gegebenen Probe- oder Kontrollösung adsorbiert wurde. Andere Substanzen, die eventuell in der Lösung waren, wurden nach der einstündigen Inkubation ausgespült.

Nach dem Auswaschen der Block & Sample-Pufferlösung wurden die Wells mit den Wirkstoffproben (je 100 µl) befüllt. NT-3 Moleküle haften an den an Welloberfläche adsorbierten Antikörpern. Neben den Proben wurden in separaten Wells auch Standardreihen von NT-3 aus dem Kit und NT-3 aus der Stammlösung des Wirkstoffes einpipettiert. (Das NT-3, welches separat vom ELISA-Kit geliefert wurde wird als „Wirkstoff“ bezeichnet.) Die gefüllte Platte wurde bei Raumtemperatur sechs Stunden unter Rütteln inkubiert und danach mit TBST gespült.

In die gewaschenen Wells wurde eine Lösung bestehend aus polyklonalem NT-3-Antikörper gegeben (anti human NT-3 pAb, ein IgY-Antikörper vom Küken). Bei 4°C konnten sich die Antikörper über Nacht an den gebundenen NT-3 anhaften. Wurden welche von den ersten Antikörpern (anti NT-3 mAb) nicht mit NT-3 besetzt, so hatte der zweite Antikörper (IgY) weniger Bindestellen. Die Anzahl der „Plätze“ für den zweiten Antikörper war nur durch die Menge des gebundenen NT-3 bestimmt, der als begrenzender Faktor im ganzen Verfahren fungierte.

Nach mehrmaliger Spülung wurde eine Lösung von Konjugat aus Meerrettichperoxidase und anti IgY-Antikörper (von Ziege, gerichtet gegen die Küken-IgY-Antikörper) in die Wells gegeben. Nach Inkubation des Konjugats und Spülung der Wells wurde eine Mischung aus TMB-Lösung und Peroxidase-Substrat dazugegeben. Durch die am anti IgY-Antikörper haftende Peroxidase wurde das Peroxidase-Substrat gespalten. Der dabei freigesetzte Sauerstoff löste eine Farbreaktion der TMB-Lösung aus. So war die Farbänderung in jedem Well quantitativ linear von der Menge der Peroxidase und dadurch auch von NT-3 Konzentration abhängig.

10-15 Minuten nach Reaktionsbeginn wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 100 µl Phosphorsäure gestoppt. Die Farbe änderte sich von blau nach gelb und blieb beständig. Mit einem Photometer wurde die Intensität der gelben Farbe (nach dem Absorptionsprinzip) gemessen. Die Absorptionswerte der Eichreihe wurden gegen die bekannten Konzentrationen

von NT-3 in einem Diagramm aufgetragen. Durch den Absorptionswert der einzelnen Wells konnte die Konzentration von NT-3 aus Eichkurve abgelesen werden.

Der erste ELISA-Test wurde mit Hilfe der Arbeitsgruppe von Dr. Rohrer am Max-Planck-Institut für Hirnforschung durchgeführt.

4.4.2. Versuche mit NT-3 *in vitro*

4.4.2.1. NT-3 ELISA, Versuch I, Untersuchung von NT-3-Stabilität in Hank's Solution, Förderungsrate durch die ALZET-Pumpen.

NT-3 sollte, laut Hersteller (Life Technologies und Promega), in Pufferlösung gelöst werden. Beide Herstellerfirmen wurden gefragt, ob die Konzentration von NaHCO_3 in der Hankslösung (H-8264 von Sigma, der Perilymphe ähnliche Zusammensetzung) ausreichende Pufferkapazität zum Auflösen von Wachstumsfaktoren hat. Nachdem es nicht verneint wurde, wurde NT-3 in den ersten Versuchen in Hanks gelöst.

Im ersten Versuch wurden zwei Parameter untersucht, der Einfluß von 0,1% Albumin auf die NT-3 Stabilität bei 37°C, sowie die Fähigkeit der osmotischen ALZET-Pumpen NT-3 zu fördern. Alle Proben wurden in sterile Caps mit 0,5 ml 0,2% Albumin in Hanks (Sammelcaps, die nichts gemeinsames mit Summenaktionspotentialen, CAPs haben) abgenommen. Die Sammelcaps mit NT-3 wurden bei -20°C eingefroren und bis zum Anfang des ELISA-Tests so gelagert.

Für die Stabilitätskontrolle wurden 100 ng/ml NT-3 (gelöst in Hanks) in Caps mit oder ohne 0,1% Albumin bei 37°C inkubiert. Die Proben aus den Caps wurden regelmäßig in die Sammelcaps abgenommen und eingefroren.

Parallel zu den Caps wurden auch mit identischer NT-3-Lösung geladene osmotische Pumpen bei 37° inkubiert (100 ng/ml in Hanks, mit oder ohne 0,1% Albumin). Die Pumpen wurden mit 2 ml Lösung geladen und förderten 5 µl/h durch den anmontierten Silikonkatheter mit einer Teflonspitze. Die Spitze des Katheters war in die Lösung der Sammelcaps eingetaucht. Nach regelmäßigen Zeitabschnitten wurden die Sammelcaps gegen neue ausgetauscht; die Sammelcaps mit NT-3 wurden eingefroren.

Da nicht bekannt war, ob die ALZET-Pumpen proteinbindende Bauteile besitzen, wurden sie vor der Füllung mit Wachstumsfaktorlösung mit Albumin beschichtet. Dafür wurden die Pumpen für 30 Minuten mit einer 0,1%-igen Albuminlösung in Hanks befüllt. Die Pumpenkerne wurden ebenfalls mit dieser Lösung gefüllt und für eine halbe Stunde in die Pumpen eingesteckt. Nach 30 Minuten wurde die Albuminlösung aus den Pumpen abgezogen

und die Wachstumsfaktorlösung geladen. Dies geschah aber nur mit den Pumpen, die im Versuch eine albuminhaltige Lösung des Wachstumsfaktors erhalten sollten. Die mit albuminloser Lösung geladenen Pumpen waren unbehandelt.

- Ergebnisse NT-3, I.

Nach Auswerten der NT-3-ELISA-Ergebnisse wurde festgestellt, daß die internen Standards eine Absorption bis zu einem Wert von 1,2 entwickelt hatten. Die externen NT-3-Standards aus der Stammlösung des Wirkstoffes hatten aber bei identischen Konzentrationen nur 25% der Absorption des internen Standards. Nichts desto trotz konnten die Proben nach dem externen Standard ausgewertet werden.

Die Konzentration von NT-3, gelöst in purem Hanks, fiel innerhalb von neun Stunden auf 4% der Ausgangskonzentration ab. In der anfänglich gleichen Lösung mit Zusatz von 0,1% Albumin sank die Konzentration in neun Stunden auf 58% der Ausgangskonzentration (das 12-fache im Vergleich zur Lösung ohne Albumin).

Ein ähnliches Ergebnismuster wurde auch mit Proben der Pumpen festgestellt. Die NT-3-Konzentrationen der Proben mit Albumin erbrachten in den ersten drei Tagen etwa 15% des erwarteten Wertes. Die späteren Proben waren wegen zu geringer Absorptionswerte nicht auswertbar. Bei den Hanks-Proben ohne Albumin fiel die NT-3-Konzentration exponentiell und betrug 24 Stunden nach dem Pumpenanlauf weniger als 1% des erwarteten Wertes.

- Rückschlüsse

Die Ergebnisse zeigten, daß die NT-3-Stabilität stark vom Albumin abhängig war. Es blieb aber unklar, warum die Proben und die externen Standards des Wirkstoffes eine so geringe Absorption hatten. Auf Rat von Promega-Service wurde NT-3 in weiteren Versuchen nicht wie bisher in Hanks, sondern in PBS gelöst. Der pK-Wert von NT-3 liegt bei über 9 (der pK-Wert entspricht dem pH-Wert, bei dem das gelöste Protein nach einer Dissoziation der Aminosäure-Reste keine Ladung trägt). Um den Wachstumsfaktor vollständig zu lösen, muß die Säurekapazität der Pufferlösung genug stark sein, um die OH⁻-Gruppen abzupuffern.

4.4.2.2. NT-3 ELISA, Versuch II, Untersuchung der NT-3-Stabilität in Phosphatpuffer

Im nächsten Versuch wurde NT-3 in gepufferter Salzlösung 10 mM, pH 7,3 (phosphate buffered saline, PBS) gelöst und nur auf Stabilität (nur in Caps, nicht in den Pumpen) getestet. Unter Zusatz von Hanks wurde zusätzlich geprüft, ob dadurch die Stabilität oder der

Gehalt von NT-3 in der Lösung beeinträchtigt wird.

Es wurden je zwei Caps mit 250 ng/ml NT-3 in purem PBS und zwei Caps mit NT-3 in PBS mit Hanks im Mischungsverhältnis 1:1 bei 37°C untersucht. Ein solcher Satz von Caps war mit dem Wirkstoff von Promega gefüllt, ein weiterer mit dem von Life Technologies. Die Proben aus den Caps wurden eine Woche lang abgenommen.

Der Hauptbefund des Experimentes war, daß PBS ein geeigneteres Lösungsmittel für NT-3 war als Hanks. Das Problem war nicht die Stabilität des Faktors oder die Qualität des ELISA-Kits, sondern die geringe Löslichkeit des Wachstumsfaktors.

Eine weitere Konsequenz war, daß der Zusatz von 50% Hanks zur Trägerlösung nach dem Auflösen von NT-3 in PBS keine Änderung der Stabilität oder der Konzentration bewirkte. Das heißt, nur das Auflösen des Wachstumsfaktors bedarf eine größere Pufferkapazität. Bei einer Verdünnung der Stammlösung war das Lösungsmittel von geringerer Bedeutung.

Die Ergebnisse der ELISA – Tests zeigten auch einen Unterschied zwischen Wirkstoffen der beiden Firmen. Die Konzentration von NT-3, das von Promega hergestellt wurde, war um ca. 25% geringer, als von dem durch Life Technologies produzierten. Dieser Unterschied wurde in allen Lösungen mit und ohne Hanks festgestellt.

4.4.2.3. NT-3 ELISA, Versuch III, Untersuchung der Auswirkung von Pumpengröße und Zusatz von Hank's Lösung zur NT-3-Lösung.

Im dritten Versuch mit NT-3 wurden nur die Proben aus den ALZET-Pumpen untersucht. Alle untersuchten Lösungen enthielten 0,1% Albumin. Die Fragestellung lautete, ob sich die NT-3-Auswurfraten der großen (2 ml Fassung, 5 µl/h Pumpgeschwindigkeit) und kleinen Pumpen (0,22 ml und 0,5 ml/h) unterscheiden? Dieser Versuch wurde viermal durchgeführt, einmal in purem PBS und einmal in PBS mit Hanks (Mischungsverhältnis 1:1) dazu gleich mit NT-3 beider Herstellerfirmen.

Die kleinen Pumpen hatten im Vergleich zu den großen ein Zehntel des Fördervolumens aber dafür die zehnfache NT-3-Konzentration. Dies sollte eine gleiche Förderrate von NT-3 aus beiden Pumpen ergeben. Die kleinen Pumpen gaben jedoch weniger NT-3 ab als die großen. Die Förderraten der großen Pumpen lagen nach einem ca. zweitägigen Anlauf bei etwa 30-35% des erwarteten Wertes. Bei den kleinen Pumpen blieben sie ab dem zweiten Tag unter 3%. Die großen Pumpen förderten NT-3 im Laufe von sieben Tagen konstant (s. Ergebnisse, Kapitel 3). Ein Problem blieb, daß die NT-3-Konzentration in einer Woche nach

Versuchsbeginn (bei 37°C) nur einen Bruchteil der Konzentration der in die Pumpen geladenen Lösung ausmachte.

4.4.2.4. NT-3 ELISA, Versuch IV, Untersuchung von NT-3 unterschiedlicher Produzenten und Einfluß von 1% Albumin in der Lösung

Auf Rat von Frau PD. Dr. M. Knipper aus der Tübinger HNO-Klinik wurde die Konzentration von Albumin in weiteren Versuchen um das 10-fache auf 1% erhöht. Der höhere Albumingehalt sollte sowohl die NT-3-Stabilität im Laufe der Zeit erhöhen, als auch Zerfall oder Absorption von NT-3 an Pumpen- und Katheteroberflächen verringern.

In diesem Versuch wurden zwei Sätze von Pumpen und Caps mit NT-3 von Promega oder Life Technologies untersucht. In jedem Satz war eine kleine und eine große ALZET-Pumpen und ein Cap. Die kleinen Pumpen wurden mit 1250 ng/ml, die großen Pumpen und die Caps mit 100 ng/ml befüllt. Alle Lösungen beinhalteten 1% Albumin. Die Proben wurden zehn Tage lang von Pumpen und Caps abgenommen.

Die Ergebnisse brachten zwei wichtige Rückschlüsse. Erstens, die kleinen Pumpen förderten nur ein Fünftel der NT-3-Menge, welche die großen Pumpen leisteten (obwohl sie um 25% mehr NT-3 liefern sollten, als die großen). Zweitens, die Pumpen mit NT-3 von Life Technologies hatten um 40% höhere Auswurfrate als die Pumpen mit NT-3 von Promega. In absoluten Zahlen ausgedrückt, die großen Pumpen mit NT-3 von Promega lieferten ca. 140 pg/h, die mit NT-3 von Life Technologies ca. 250 pg/h. Auch in den Caps mit NT-3 von Life Technologies war die Konzentration um etwa 20% höher, als in den Caps mit NT-3 von Promega.

Wegen der kleinen Auswurfrate der kleinen Pumpen wurden in weiteren Versuchen nur die großen Pumpen eingesetzt. Unabhängig vom NT-3-Hersteller stieg die NT-3-Förderrate bei diesen Pumpen über drei Tage an. Die am dritten Tag erreichte Pumprate blieb weiter stabil. (s. auch Ergebnisse, Kapitel 3, Abbildungen 16 und 17)

Obwohl NT-3 von LifeTechnologies und von Promega identisch gelöst und verdünnt wurden, war die NT-3-Konzentration in den Proben von LifeTechnologies immer höher. Aus diesem Grund wurde in den *in vivo* Versuchen NT-3 nur von Life Technologies eingesetzt, die NT-3-Konzentration in Pumpen auf 1000 pg/ml erhöht.

4.5. Applikation des Wachstumsfaktors *in vivo*

4.5.1. Implantation der ALZET-Pumpen

4.5.1.1. Sterile OPs

Implantationen der ALZET-Pumpen (zusammen mit CAP-Elektroden) wurden unter voll sterilen Bedingungen durchgeführt. Während der Operation war das Tier mit einem kleinen sterilen OP-Lochtuch abgedeckt. Das Tuch verdeckte den ganzen Körper, nur der Kopf und die rasierten und desinfizierten Hautpartien blieben frei.

Auf das Lochtuch und die offene sterile Haut wurde ein Einwegtuch aus Syntyon gelegt. In diesem Tuch wurde ein kleines Loch ausgeschnitten, dadurch war nur die für Operation notwendige Oberfläche zugänglich. Das Tuch wurde mit sieben unterbrochenen Nähten an der Haut des Meerschweinchens fixiert (eine Naht rostral und je zwei Nähte am Rücken, vor und hinter den Ohrmuscheln).

Die ersten Schritte der Operation waren analog, wie bei der Implantation von CAP-Elektroden alleine. Nach dem Legen der Hautschnitte und Aufklappen der seitlichen Hautlappen, wurde eine Hauttasche am Rücken (zwischen den Rückenmuskeln und der Haut) zwischen den Schultblättern mit einer runden Schere stumpf aufpräpariert. In die Hauttasche wurde die befüllte Pumpe eingeführt. Die Knochenhaut wurde von der Scheiteloberfläche abgetragen, die rechte und die linke Bulla freigelegt, trepaniert und die CAP - Goldelektroden an die Knochenleisten der runden Fenster gelegt.

4.5.1.2. Implantation für lokale Applikation

Die Pumpenkatheter wurden immer nur einseitig (an das runde Fenster der **rechten** Cochlea) implantiert. Bevor die rechte Bulla mit Paladur[®] verschlossen wurde, wurde ein nicht resorbierbarer Filz aus Dakron[®] an die Oberfläche des runden Fensters aufgelegt. Der Filz wurde mit Ringerlösung getränkt und auf die Kugelspitze einer speziell gezogenen Glaspipette aufgebracht. Der Dakron[®]-Filz wurde mit der Glaskugel in die Knochennische über die Membran des runden Fensters gelegt. Die runde Spitze der Glaspipette erlaubte ein verletzungsfreies Hantieren an der Membran des runden Fensters.

Die Katheterspitze wurde an der Schädeloberfläche, durch die trepanierte Öffnung in die Bulla zum Filz geleitet. Die aus dem Katheter austretende NT-3- oder Kontrollösung wurde vom Filz aufgefangen und hielt die Oberfläche des runden Fensters ständig benetzt. Nachdem die Katheterspitze in der Bulla positioniert war, wurde die Bullaöffnung mit Paladur verschlossen. Dadurch wurde die CAP-Elektrode und der Katheter an Bulla fixiert und

zuverlässig immobilisiert.

Die CAP-Elektroden wurden unter den Muskeln zur freigelegten Knochenoberfläche am Scheitel geleitet, der Stecker für CAP-Ableitungen an der Schädeldecke montiert und die Elektroden an ihn angelötet. Wenn das Plastik ausgehärtet war, wurde die ganze Oberfläche der Wunde mit Ringerlösung gewaschen und die Wunden zugenäht (siehe auch 1.2.2. Implantation der Elektroden).

4.5.1.3. Implantation für systemische Applikation

Für systemische NT-3-Applikation wurden nach dem Legen der CAP-Elektroden die beiden Bullae mit Paladur[®] verschlossen. Die Pumpe wurde in die Hauttasche am Rücken implantiert. Der Schädel wurde an der freigelegten Knochenoberfläche am Scheitel **zwei mal** mit einem Rosenbohrer trepaniert. In die rostral gebohrte Öffnung wurde die Schraube des Steckers gelegt und angezogen. Nach dem Anlöten der CAP-Goldelektroden an den Stecker wurde in die zweite 2,5 mm kaudal von der ersten gebohrte Öffnung die Spitze des Pumpenkatheters eingeführt, die bis in den Liquorraum hinreichte. Die NT-3- oder die Kontrollösung konnten durch die Zerebrospinalflüssigkeit in die Perilymphe der Cochlea gelangen. Der resorbierte NT-3 konnte auch auf dem Weg durch die Blutbahn die Cochleae erreichen.

Anschließend wurde der Stecker samt der Katheterspitze mit Plastik übergossen und dadurch an der Knochenoberfläche fixiert. Die Wunde wurde mit der Ringerlösung befeuchtet und verschlossen (siehe auch 1.2.2. Implantation der Elektroden).

4.5.2. Infektionsverminderung

Um die Infektionsgefahr während der Implantation der Pumpen zu vermindern, wurden Chemotherapeutika eingesetzt. Nach Beratung des Tierarztes der Uniklinik Dr. Kock wurde ein Chemotherapeutikum (Metronidazol 500[®], 0,5 mg/ml, Fresenius Kabi KG&Co, Bad Homburg) eingesetzt. 1 ml der Metronidazol - Lösung wurde direkt auf die Wunde und in die Hauttasche am Anfang der Operation und kurz vor Zünähen der Wunde gegeben. Ein weiterer Schutz vor Infektion wurde durch die Polyvidon-Jodsalbe verliehen, die nach dem Zünähen auf die Wunden aufgetragen wurde. Durch die Anwendung von Metronidazol und Jodsalbe konnten Infektionen auf nur einzelne Fälle reduziert werden.

5. Histologie

Nach Beendigung der physiologischen Experimente (am 32. Tag nach der Ototoxika-Infusion) wurden die Innenohren der Tiere histologisch untersucht. Nach der CAP-Messung waren sie im tiefen Narkosezustand. Zusätzlich wurden ihnen 2 ml Nembutal® (60 mg/ml Pentobarbital, Sanofi Ceva) intracardial gespritzt. Diese Dosis von Pentobarbital lähmte innerhalb von wenigen Sekunden das zentrale Nervensystem.

Der Brustkorb wurde geöffnet und das Pericard aufgeschnitten. Die beiden Herzventrikel wurden separat aufgeschnitten, in den linken Ventrikel wurde eine stumpfe Kanüle eingeschoben und mit Arterienklemme am Ventrikelrand fixiert. Durch die Kanüle wurde eine Spüllösung (Ringerlösung mit einem Zusatz von Xylocain®) mit einem Druck von 120 mm Hg gespritzt. 0,5 Liter dieser Lösung spülte das Blut aus dem großen Kreislauf in etwa etwa 5-7 Minuten aus.

Anschließend wurde das Tier mit einer Fixierlösung (4%-ige Lösung von Formalin in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,3) perfundiert. In 5 Minuten wurde es durch etwa 0,5 l der Fixierlösung von Innen fixiert. Die Cochleae wurden herauspräpariert und konnten in der Fixierlösung über mehrere Wochen bis Monate bis zur histologischen Untersuchung bei +4°C aufbewahrt werden.

5.1. Präparation der Cochleae

Die Cochleae wurden aus der Fixierlösung herausgenommen und unter Mikroskop in PBS aufgearbeitet. Als erstes wurde der Knochen der äußeren Cochleaschale entfernt. Das Corti'sche Organ lag am äußeren Rand vom Modiolus. Seine knöcherne Leiste wurde mit einer spitzen Pinzette entlang und möglichst nahe am Corti'schen Organ schrittweise gebrochen. Dadurch wurden Häutchenpräparate des Corti'schen Organs mit einer Länge von bis zu 1,5 Cochleawindungen hergestellt.

Die Präparate wurden von apikal nach basal in mehreren Stücken vom Modiolus abgetragen. Dabei wurde notiert, von welcher Stelle der Cochlea jedes Präparat stammte. In den späteren Auswertungsschritten konnten die Windungen der Cochlea rekonstruiert werden.

5.2. Färbung

Die Präparate mit Corti'schem Organ wurden in 2 ml PBS bei +4°C eine Stunde bis über Nacht inkubiert und anschließend gefärbt. Die Farblösung wurde aus einer Rhodamin-

Phalloidon-Stammlösung (Phalloidin, TRITC labeled, Sigma-Aldrich, 300 U/ml, gelöst im puren Methanol) und PBS mit einem Verhältnis 1:100 hergestellt. Alle Färbungsschritte wurden unter Lichtausschluß durchgeführt. Die Gewebepräparate wurden aus PBS mit feiner Pinzette in die Farblösung gebracht und 30 Minuten inkubiert. Aus der Farblösung wurden die Präparate in pures PBS zum Kontrastieren überbracht und 15 Minuten gespült.

Die kontrastierten Gewebepräparate wurden auf Objektträger plaziert und eingedeckt. Als Deckmedium wurde KAISERS Glyceringelatine (Merck, Darmstadt) mit 10% Diazabicyclooktan (**DABCO**, Sigma-Aldrich) benutzt. Die Glyceringelatine hielt nach dem Abkühlen das Deckglas fest und verhinderte Austrocknen der Präparate. DABCO fungierte als Konservierungsstoff für den fluoreszierenden Farbstoff Rhodamin.

5.3. Aufnahme und Montieren der Bilder

Die fertiggestellten Präparate wurden in Alufolie vor Licht geschützt und bei +4°C bis zum Mikroskopieren aufbewahrt. Die Bilder wurden fluoreszenzmikroskopisch mit Anregung bei 546 nm (grün) und Aufnahme bei 610 nm Wellenlänge (rot) aufgenommen. Die Lichtquelle für das ZEISS-Mikroskop war ein Quecksilber-Höchstdruckbrenner. Die Präparate wurden visuell beurteilt und anschließend mit HAMAMATSU Videokamera digital aufgenommen. Die größeren Stücke des Corti'schen Organs wurden mit mehreren Aufnahmen entlang des Präparates dokumentiert.

Die zusammenmontierten Bilder wurden ausgewertet und die Stellen in der Präparate mit fehlenden inneren oder äußeren Haarzellen notiert. In einer weiteren Auswertung wurde rekonstruiert, von welchen Stellen der Cochlea die einzelnen Präparate stammten. Die Cochlea wurde beschrieben und anschließend die anatomischen Daten mit den CAP-Hörschwellen verglichen.

Ergebnisse

1. Kontrollhörschwellen

Eine Woche nach Implantation der CAP-Elektroden, vor der Hörschädigung, wurden die Kontrollhörschwellen der unbehandelten Tiere gemessen. Aus diesen Hörschwellen wurde die mittlere gesunde Hörschwelle ermittelt (s. Abbildung 7). Die Hörschwellen der Tiere mit implantierten osmotischen Pumpen wurden hier nicht einbezogen.

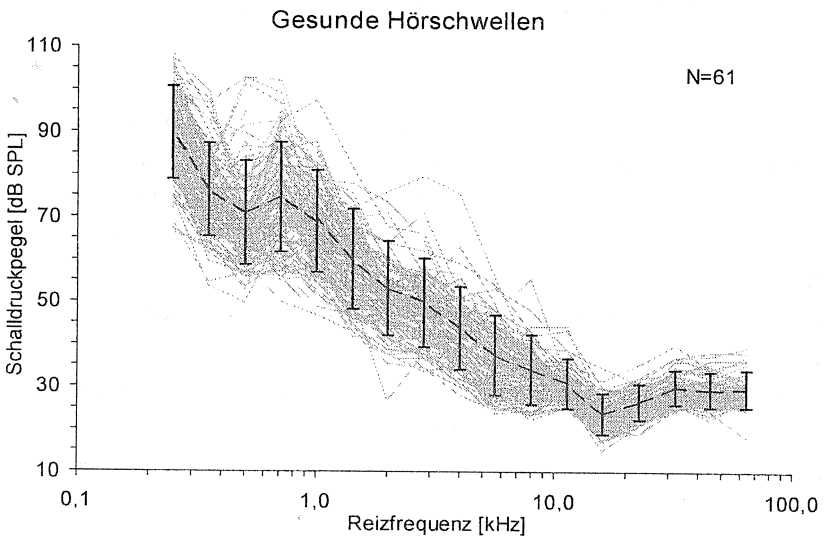


Abbildung 7. Die Hörschwellen der mit CAP-Elektroden implantierten Versuchstiere vor der Infusion der Ototoxika. Jede dünne graue Linie bedeutet Hörschwelle eines Ohres. Die dickere unterbrochene Linie stellt den Mittelwert mit Standardabweichungen dar. Schwellenpegel (in dB SPL) sind gegen die Reizfrequenz aufgetragen.

Alle Hörschwellen wurden auf Ausreißer untersucht. Wenn eine Kontrollhörschwelle bei mehr als zwei Frequenzen von der mittleren Hörschwelle um mehr als doppelte Standardabweichung abwich, wurden die Hörschwellen dieses Ohres in die Ergebnisse nicht

einbezogen. Die mittlere gesunde Hörschwelle lag zwischen 24 dB SPL bei 16 kHz und 90 dB SPL bei 0,25 kHz. Die Standardabweichungen waren bei den hohen Frequenzen geringer als bei den tiefen und betrugen von 4,1 dB bei 32 kHz bis 12,9 dB bei 0,7 kHz (bei allen Frequenzen durchschnittlich 8,6 dB).

Eine weitere Kontrolle war der Vergleich von Hörschwellen der linken und der rechten Ohren vor der Infusion der Ototoxika. Abbildung 8 stellt die mittleren Hörschwellen der linken ($n=59$) und der rechten Ohren ($n=52$) in dB SPL dar. Diese Hörschwellen unterschieden sich durchschnittlich nur um 0,8 dB (die rechten Ohren hatten etwas höhere Hörschwellen als die linken). Die Standardabweichungen links (durchschnittlich 6,5 dB) waren auch geringer als rechts (7,2 dB). Der Unterschied zwischen den Hörschwellen links und rechts war nicht signifikant.

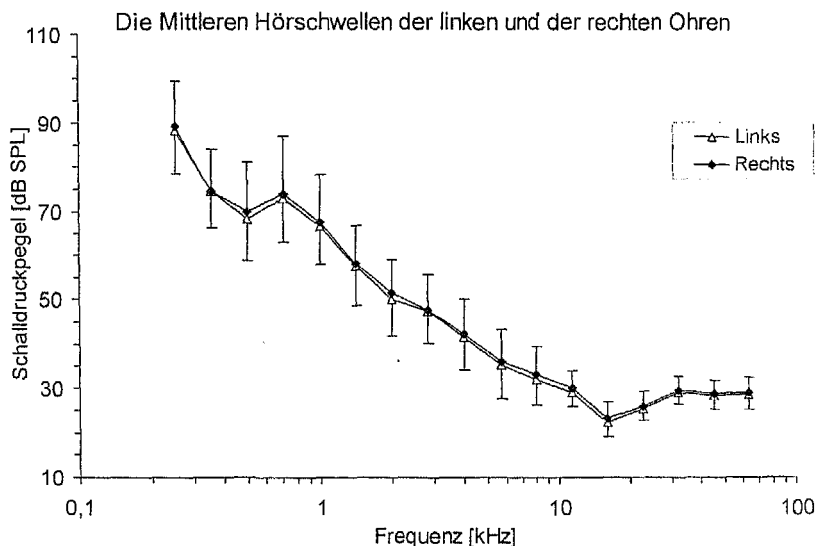


Abbildung 8. Die mittlere Linke und mittlere rechte Hörschwellen der mit CAP-Elektroden implantierten Versuchstiere vor der Infusion der Ototoxika. Die Standardabweichungen der linken Hörschwellen sind nach unten, die der rechten nach oben abgebildet. Schwellenpegel (in dB SPL) sind gegen die Reizfrequenz (in kHz) aufgetragen.

2. Modell der Hörschädigung

Die erste Experimentenreihe befaßte sich mit dem Modell der Hörschädigung. Durch intravenöse Infusion von Kanamycin und Ethakrynsäure sollte ein partieller Hörschaden erzeugt werden. Da es nur bekannt war, welche Dosierung das Hörvermögen total schädigt, wurden Experimente mit mehreren geringeren Dosierungen durchgeführt und das für unsere Zwecke wichtige Dosis-Wirkung-Verhältnis beider Wirkstoffe ermittelt.

2.1. Mögliche Stärke der Hörschwellenverluste.

Eine Woche nach der Messung der Kontrollhörschwellen wurden den Tieren Kanamycin und Ethakrynsäure i.v. infundiert. Am 2., 4., 8., 16. und 32. Tag nach dieser Infusion wurden die Hörschwellen gemessen und die entstandenen Hörverluste ermittelt. Abgesehen von der Dosierung der Ototoxika konnten die Hörverluste nach seiner Stärke in drei Grundtypen unterteilt werden:

- totale Hörverluste
- frequenzspezifische partielle Hörschäden
- keine Hörschäden

2.1.1. Totaler Hörverlust

Wenn nach der Ototoxika-Infusion die Hörschwellen so angestiegen waren, daß sie nicht mehr gemessen werden konnten, wurde der Zustand als totaler Hörverlust (Taubheit) definiert. In dem Fall, der in der Abbildung 9 dargestellt wurde, (Dosierung: 266 mg/kg Kanamycin und 40 mg/kg Ethakrynsäure) lagen die Hörschwellen nach der Infusion der Ototoxika über den maximalen Schalldruckpegeln unseres Lautsprechers.

In den zeitlichen Veränderungen der Hörschwellen (Abbildung 10) wurde ein sprungartiger Schwellenverlust bereits am zweiten Tag nach der Ototoxika-Infusion festgestellt. Bereits an diesem Tag erreichte der Hörverlust sein *meßbares* Maximum (mit der Ausnahme der Hörschwelle bei 1 kHz, die ab dem Tag 8 über dem maximalen Schalldruck des Systems lag).

Der gemessene Hörschwellenverlust betrug bei allen Frequenzen durchschnittlich 64 dB (27-87 dB). Die maximalen Verluste (über 70 dB) lagen im Frequenzbereich 2-32 kHz. Die Hörschwellen lagen bei allen Frequenzen an oder über der maximalen Leistungsgrenze des Systems (Abschwächung 0 dB).

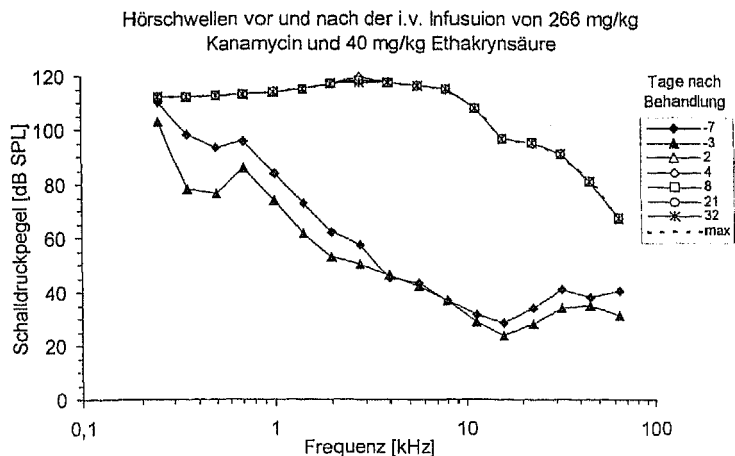


Abbildung 9. Hörschwellen eines Ohres, bei dem die Infusion der Ototoxika einen totalen Hörverlust ausgelöst hat. Die negativen Zahlen in der Legende bedeuten Tage vor, die positiven die Tage nach der Infusion der Ototoxika. Als "max" wird der maximale Schalldruckpegel des Systems bezeichnet.

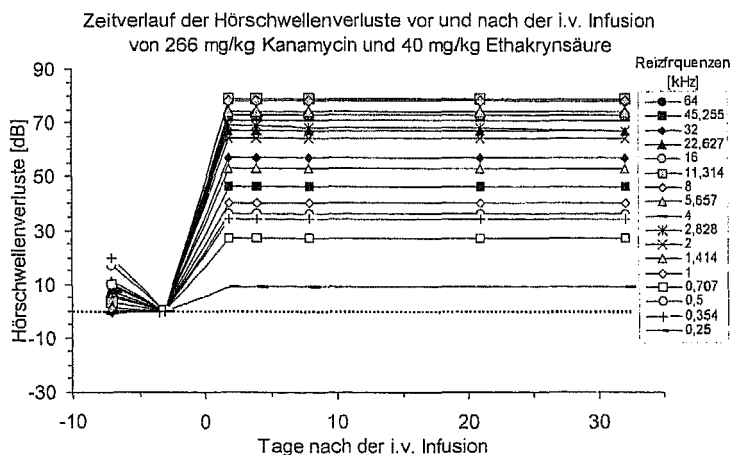


Abbildung 10. Zeitlicher Verlauf der Hörschwellenverluste eines Ohres, bei dem die Infusion der Ototoxika einen totalen Hörverlust ausgelöst hat. Die Ototoxika wurden am Tag 0 infundiert, als Referenz wurde die letzte Messung vor der Infusion genommen. Jede einzelne Linie stellt den Verlust der Hörschwelle (in dB) bei einer bestimmten Frequenz dar.

2.1.2. Frequenzspezifischer partieller Hörverlust.

Die partiellen Hörschäden zeichneten sich dadurch aus, daß sie bei unterschiedlichen Frequenzen unterschiedliche Stärke erreichten. Ein Beispiel davon ist in der Abbildung 11 dargestellt.

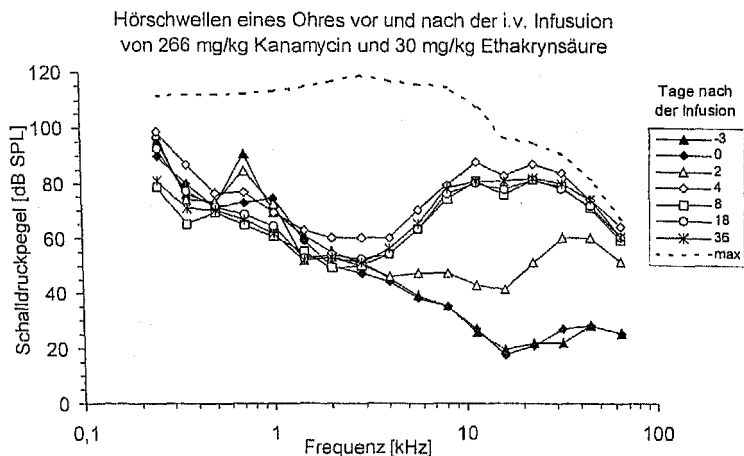


Abbildung 11. Hörschwellen eines Ohres, bei dem die Infusion der Ototoxika einen partiellen Hörverlust ausgelöst hat. Die negative Zahl in der Legende bedeutet Tage vor, die positiven die Tage nach der Infusion der Ototoxika. Als "max" wird der maximale Schalldruckpegel des Systems bezeichnet.

Bei den höheren Frequenzen (11-64 kHz) war der Schwellenverlust am stärksten und erreichte bis zu 66 dB. Der mittlere Frequenzbereich (8-4 kHz) stellte einen Übergang vom starken zum minimalen Verlustbereich dar. Im Bereich der tiefen Frequenzen (0,25-2 kHz) hat sich kein Schaden entwickelt.

Die zeitlichen Verläufe der Hörschwellenverluste waren in diesem Fall nicht so homogen, wie die bei totalen Hörverlusten (Abbildung 12).

1. Es wurden Schwankungen zwischen den Tagen festgestellt.
2. Nach der Infusion von Kanamycin und Ethakrynsäure entstand ein Hörverlust nicht sprungartig, sondern entwickelte sich bis zum vierten Tag. Danach gab es nur minimale Schwankungen der Hörschwellen.
3. Die Hörschwellen im tieffrequenten Bereich wurden generell, im Vergleich zu den Hörschwellen vor der Infusion, tiefer.

Zeitverlauf der Hörschwellenverluste vor und nach der i.v. Infusion
von 266 mg/kg Kanamycin und 30 mg/kg Ethakrynsäure

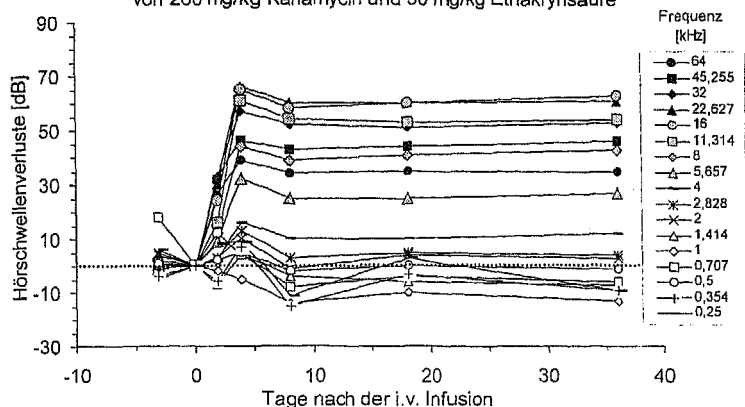


Abbildung 12. Zeitlicher Verlauf der Hörschwellenverluste eines Ohres, bei dem die Infusion der Ototoxika einen partiellen Hörverlust ausgelöst hat. Die Ototoxika wurden am Tag 0 infundiert, als Referenz wurde die letzte Messung vor der Infusion genommen. Jede einzelne Linie stellt den Verlust der Hörschwelle (in dB) bei einer bestimmten Frequenz dar.

Hörschwellen vor und nach der i.v. Infusion
von 266 mg/kg Kanamycin und 20 mg/kg Ethakrynsäure

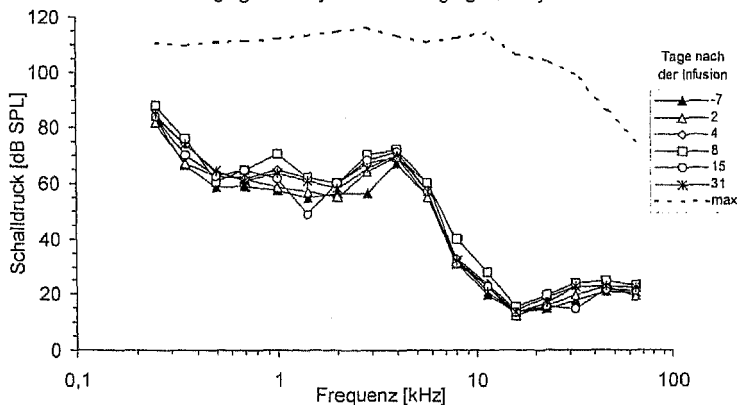


Abbildung 13. Hörschwellen eines Ohres, bei dem die Infusion der Ototoxika keine Hörschäden ausgelöst hat. Die negative Zahl in der Legende bedeutet Tage vor, die positiven die Tage nach der Infusion der Ototoxika. Als "max" wird der maximale Schalldruckpegel des Systems bezeichnet.

2.1.3. Keine Hörverluste

Die Hörschwellen vor und nach der Infusion von Kanamycin (266 mg/kg) und Ethakrynsäure (20 mg/kg) waren ähnlich (s. Abbildung 13). Durchschnittlich entstand ein Schwellenverlust von $4,2 \pm 2,8$ dB, der aber nicht signifikant war.

2.2. Die mittleren Hörverluste bei unterschiedlichen Dosierungen der Ototoxika

Aus Hörschwellen der gleich behandelten Tiere wurden Mittelwerte gebildet. Dadurch ergaben sich 12 Mittelwerte (von 12 Dosierungskombinationen von Kanamycin und Ethakrynsäure, s. Methodikteil 2.2, Abbildung 14a + 14b), die in vier dreier Gruppen in Schritten der Ethakrynsäure-Dosierung (0, 20, 30 oder 40 mg/kg) analysiert werden.

2.2.1. Ethakrynsäure 0 mg/kg

Die Hörverluste der Tiere, die Kanamycin 133, 266 oder 400 mg/kg und keine Ethakrynsäure erhalten haben, sind minimal und nicht frequenzspezifisch (s. Abbildung 14 a, untere Reihe). Der mittlere Schwellenverlust betrug $4,7 \pm 3,2$ dB bei 133 mg/kg, $4,7 \pm 1,8$ dB bei 266 mg/kg und $2,6 \pm 2,3$ dB bei 400 mg/kg Kanamycin. Diese Schwellenverluste waren nicht signifikant.

2.2.2. Ethakrynsäure 20 mg/kg

Die drei weiteren Dosierungskombinationen bestanden aus 133-400 mg/kg Kanamycin und 20 mg/kg Ethakrynsäure. Unabhängig von der Kanamycin-Dosierung waren die Schwellenverluste durch die Infusion der Ototoxika auch nur minimal (Abbildung 14 a, obere Reihe). Mit 133 mg/kg Kanamycin (und 20 mg/kg Ethakrynsäure) gab es bei allen Frequenzen durchschnittlich sogar einen Abfall der Hörschwellen ($-0,7 \pm 2,6$ dB). Mit 266 mg/kg Kanamycin wurde ein Schwellenverlust von $3,3 \pm 1,8$ dB mit 400 mg/kg $4,9 \pm 2,6$ dB erzeugt. Die mittleren Hörverluste waren von der gleichen Größenordnung, wie auch bei der Behandlung ohne Ethakrynsäure. Diese geringen Hörverluste und ihre abwesende Frequenzspezifität weisen auf keine oder nur minimale hörschädigende Wirkung von 133 bis 400 mg/kg Kanamycin mit 20 mg/kg Ethakrynsäure.

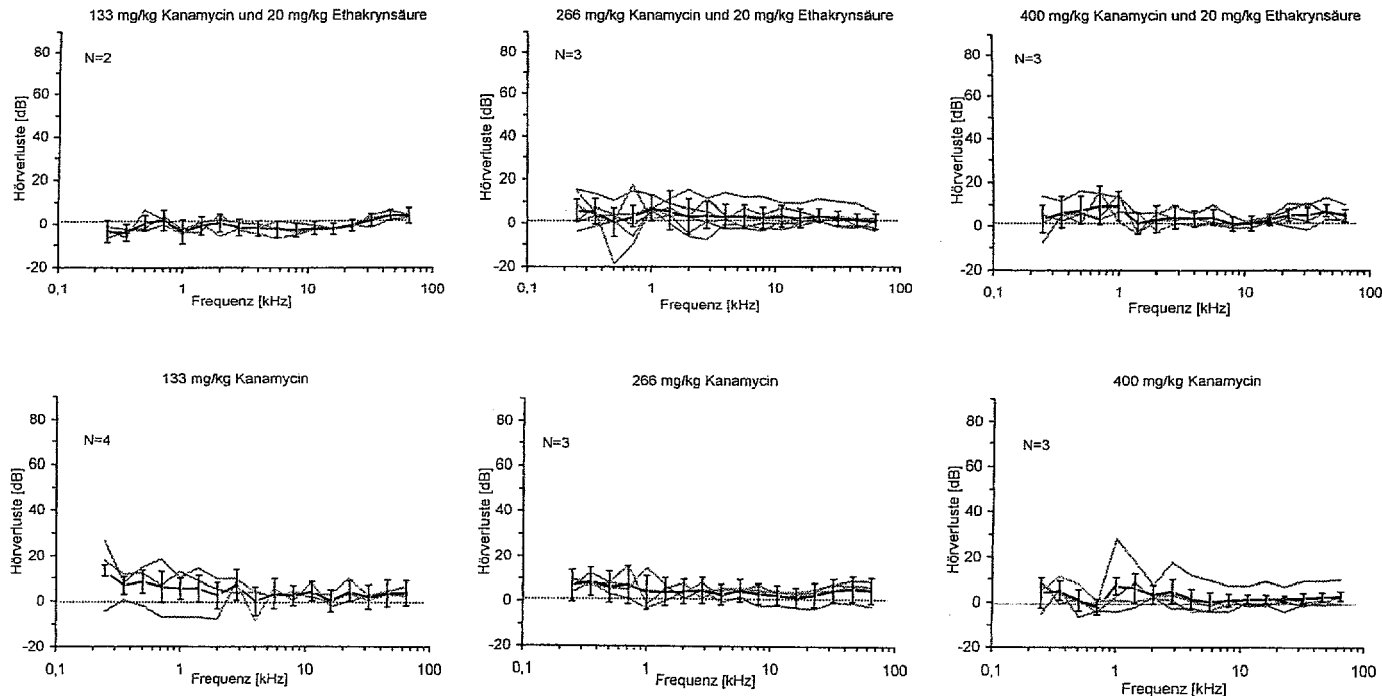


Abbildung 14a. Hörverluste mit Dosierungen von 0 und 20 mg/kg Ethakrynsäure. Jede einzelne Linie bedeutet den mittleren Hörverlust an einem Ohr an den Tagen 4-32 nach der Infusion der Ototoxika. Die stärkeren gestrichelten Linien stellten die mittleren Hörverluste dar, die mit dieser Dosierung erzeugt wurden. Die dünne gestrichelte Linie (bei 0 dB) steht für die mittlere Hörschwelle derselben Tiere vor der Infusion der Ototoxika. Die Standardabweichungen bedeuten Schwankungen zwischen den Tagen 4-32 nach der Infusion der Ototoxika.

2.2.3. Ethakrynsäure 30 mg/kg

Die Hörschwellenverluste bei den Tieren, die mit 30 mg/kg Ethakrynsäure infundiert wurden, erweisen eine hohe Streuung. Unabhängig von der Kanamycindosierung (133, 266 oder 400 mg/kg) wurden alle drei Typen von Hörschäden in jeder Tiergruppe erzeugt: keine, partielle (oder frequenzspezifische) und totale Hörverluste (Abbildung 14 b, untere Reihe). Die Mittelwerte der Schwellenverluste unterscheiden sich aber dosierungsabhängig voneinander, mit der Zunahme der Kanamycin-Dosis nahm der Hörverlust zu.

Die mittleren Hörschwellenverluste bei allen Frequenzen lagen bei $20,6 \pm 8$ dB mit 133 mg/kg, $24,3 \pm 13,9$ dB mit 266 mg/kg und $35,6 \pm 11,5$ dB mit 400 mg/kg Kanamycin. Diese Schwellenverluste waren frequenzspezifisch. So waren sie im hohen und mittleren Frequenzbereich (2-64 kHz) mit 133 mg/kg Kanamycin 26 (20-31) dB. Mit 266 mg/kg Kanamycin lagen sie bei 33 (21-41) dB, mit 400 mg/kg bei 43 (33-49) dB.

Im tiefen Frequenzbereich (0,25-1,4 kHz) waren die Schwellenverluste geringer. Mit 133 mg/kg Kanamycin betrugen sie 11,4 (5-18) dB, mit 266 mg/kg 7,8 (2-16) und mit 400 mg/kg 22,4 (15-31) dB.

2.2.4. Ethakrynsäure 40 mg/kg

Bei den Tieren, die 40 mg/kg Ethakrynsäure erhalten haben, waren die Hörverluste mit Ausnahme der Dosierung mit 133 mg/kg Kanamycin fast ausnahmslos total (s. Abbildung 14b, obere Reihe). Die mittleren Schwellenverluste lagen mit dieser Dosierung bei $35,6 \pm 11,5$ dB, was in der Größenordnung der Dosierung von 400 mg/kg Kanamycin mit 30 mg/kg Ethakrynsäure entspricht. Diese Verluste waren frequenzspezifisch. Bei den hohen und mittleren Frequenzen (2-64 kHz) lagen sie bei 44 (32-50) dB, bei den tiefen (0,25-1,4 kHz) dagegen nur bei 20 (11-28) dB.

Die mittleren Schwellenverluste betrugen $60,2 \pm 18,9$ dB mit 266 mg/kg Kanamycin und $61,4 \pm 18,4$ dB mit 400 mg/kg. Obwohl die mittleren Verluste in den hohen und mittleren (2-64 kHz, 71 und 72 dB) und in den tiefen (0,25-1,4 kHz, 41 und 43 dB) Frequenzbereichen sich unterscheiden, lagen die absoluten Hörschwellen in dB SPL über den maximalen Schalldruckpegeln des Systems.

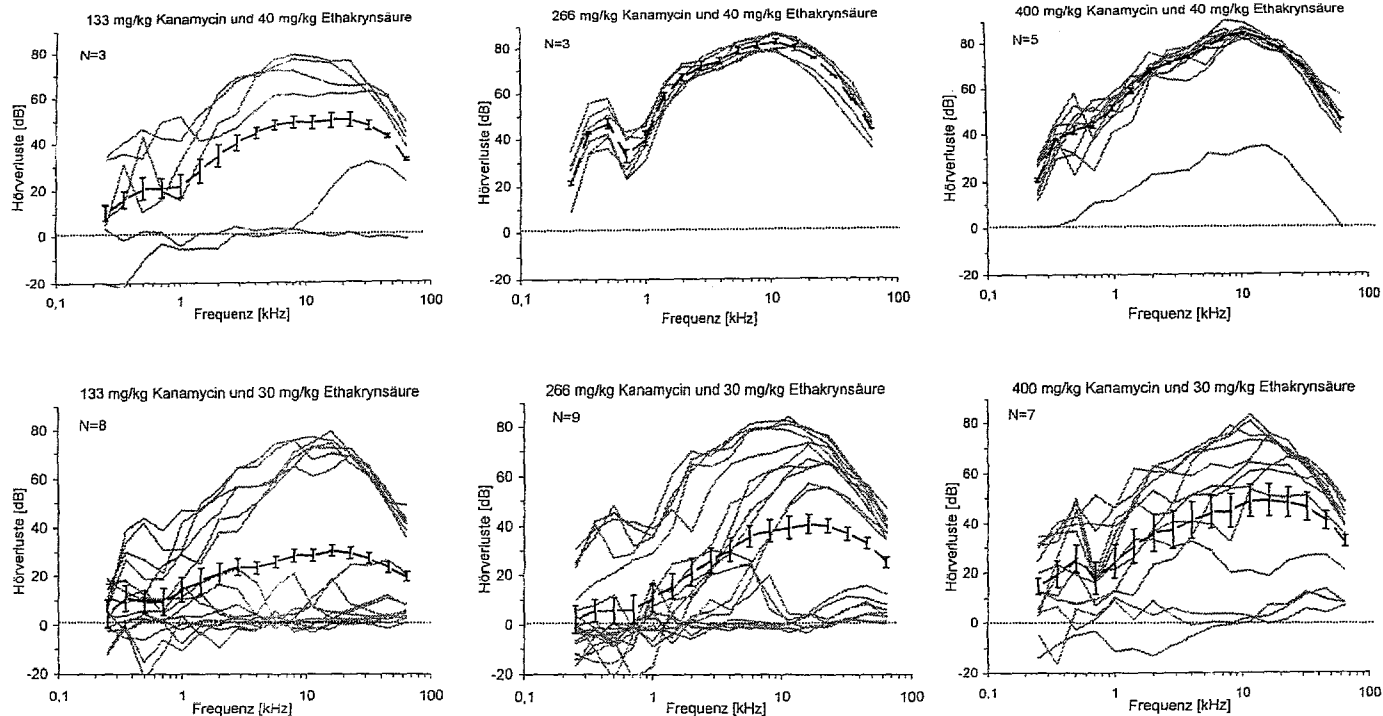


Abbildung 14b. Hörverluste mit Dosierungen von 30 und 40 mg/kg Ethakrynsäure. Jede einzelne Linie bedeutet den mittleren Hörverlust an einem Ohr an den Tagen 4-32 nach der Infusion der Ototoxika. Die stärkeren gestrichelten Linien stellten die mittleren Hörverluste dar. Die dünne gestrichelte Linie (bei 0 dB) steht für die mittlere Hörschwelle derselben Tiere vor der Infusion der Ototoxika. Die Standardabweichungen bedeuten Schwankungen zwischen den Tagen 4-32 nach der Infusion der Ototoxika.

2.2.5. Die mittleren Hörschwellenverluste aller Dosierungen in Übersicht.

Wenn alle mittleren Schwellenverluste zusammen bewertet wurden, so war eine Zunahme der Hörverluste mit der Zunahme der Dosis von Ethakrynsäure zu beobachten. Mit ihren Dosierungen von 0 und 20 mg/kg und allen getesteten Kanamycin-Dosierungen waren die Schwellenverluste nur minimal und nicht frequenzspezifisch. Gabe von 30 mg/kg Ethakrynsäure mit allen Dosierungen von Kanamycin (133-400 mg/kg) und die Kombination von 133 mg/kg Kanamycin mit 40 mg/kg Ethakrynsäure erzeugten durchschnittlich partielle und frequenzspezifische Schäden. Die Kanamycin-Dosierungen von 266 und 400 mg/kg mit 40 mg/kg Ethakrynsäure lösten totale Hörverluste aus (s. Abbildung 15).

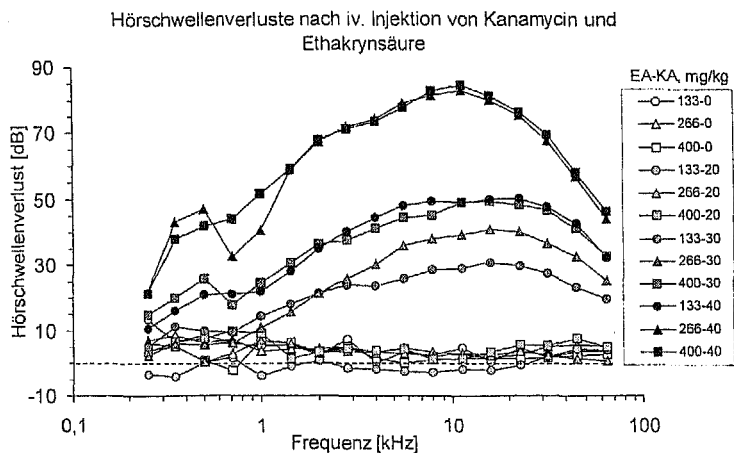


Abbildung 15. Die mittleren Hörschwellenverluste in dB bei Meerschweinchen an den Tagen 4-32 nach der Infusion von Kanamycin und Ethakrynsäure. Die Hörschwellenverluste aller gleichbehandelten Tiere wurden zu Mittelwerten zusammengefasst. Jede Linie bedeutet eine Dosierung. Die Schwellenverluste sind relativ zu den Kontrollhörschwellen vor der Behandlung mit Ototoxika aufgetragen.

Die höchste Frequenzspezifität der Schwellenverluste wurde mit der Dosierung von 266 mg/kg Kanamycin und 30 mg/kg Ethakrynsäure erzielt. Die mittleren Hörverluste waren hier $24 \pm 13,9$ dB. Bei den hohen Frequenzen (16-64 kHz) waren sie 35 dB, bei mittleren (2-11,3

kHz) 32 dB und 7,8 dB bei den tiefen Frequenzen (0,25-1,4 kHz). Deshalb wurde in den Versuchen mit Wachstumsfaktoren diese Dosierung zur partiellen Ertaubung der Meerschweinchen verwendet.

3. Applikation der Wachstumsfaktoren

Die Daten über die NT-3-Stabilität bei 37°C und Abgaberate dieses Faktors aus den Pumpen wurden bereits im Methodenteil vorgestellt. Die Konzentration einer NT-3-Lösung von 500 ng/ml mit 1% Albumin in PBS blieb im Laufe einer Woche stabil (Abbildung 16). Die großen ALZET-Pumpen (Fassungsvolumen 2 ml), gefüllt mit gleicher Lösung lieferten etwa 50% der NT-3-Konzentration ab dem dritten Tag nach Experimentenanfang (s. Abbildung 17). Für die *in vivo* Versuche wurde NT-3-Konzentration in den Pumpen auf das doppelte (1000 ng/ml) erhöht.

3.1. Auswirkung der Pumpenimplantation und der i.v. Infusion auf die Hörschwellen

Bevor die *in vivo* Versuche mit Wachstumsfaktoren begonnen wurden, wurde untersucht, welche Wirkung die implantierten und mit 1% Albumin in PBS gefüllten Mikropumpen auf die Hörschwellen in Meerschweinchen ausübten. Vier Tage nach Implantation der Pumpe und der CAP-Elektroden wurden Kontroll-Hörschwellen gemessen. Direkt nach der Messung wurde den Meerschweinchen nur Phosphatpuffer (PP) anstatt von 266 mg/kg Kanamycin und 30 mg/kg Ethakrynsäure i.v. infundiert. Die Hörschwellen der rechten, mit Mikropumpen implantierten Ohren wurden mit den linken Ohren derselben Tiere verglichen, die keine Pumpen hatten.

Abbildung 18 zeigt die Hörschwellen vor und nach der i.v. Infusion des Phosphatpuffers. Bereits am vierten Tag nach der Implantation (Tag 0), bevor PP i.v. gespritzt wurde, waren die Hörschwellen der mit Pumpenkatheter implantierten Ohren höher als die der Ohren ohne Katheter. Der Unterschied betrug durchschnittlich 4,5 dB und erreichte bei den tiefen und hohen Frequenzen bis zu 10 dB.

Die am 4.-32. Tagen nach der PP-Infusion gemessenen Hörschwellen wurden als Mittelwerte (aller Messungen und aller Tiere) zusammengefaßt. Die Hörschwellen der nicht implantierten (linken) Ohren hatten innerhalb von 32 Tagen nach der Infusion keine Verluste (und verbesserten sich sogar um 2,0 dB).

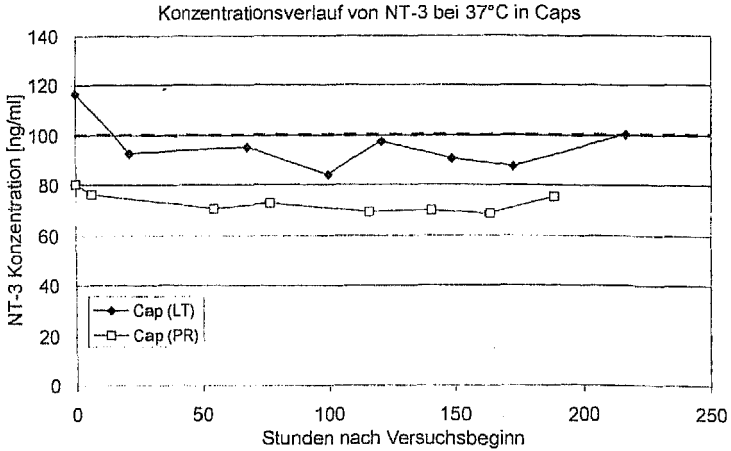


Abbildung 16. Zeitlicher Konzentrationsverlauf von NT-3 in Caps bei 37°C. Die anfängliche Konzentration von NT-3 betrug in allen Caps 100 ng/ml (unterbrochene Linie). Die NT-3 Herstellerfirmen werden als "LT" (Life Technologies) oder "PR" (Promega) bezeichnet.

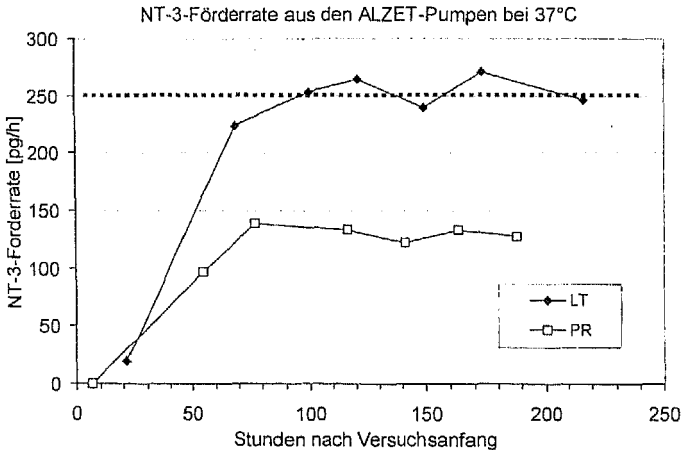


Abbildung 17. Zeitlicher Verlauf der NT-3-Auswurfrate aus den osmotischen ALZET-Pumpen (2 ML2, Fassungsvermögen 2 ml) bei 37°C. Die theoretisch zu erwartende Auswurfrate von NT-3 betrug 500 pg/h. Die erreichte Auswurfrate betrug 50% des erwarteten Wertes (punktuelle Linie). Die NT-3 Herstellerfirmen werden als "LT" (Life Technologies) oder "PR" (Promega) bezeichnet.

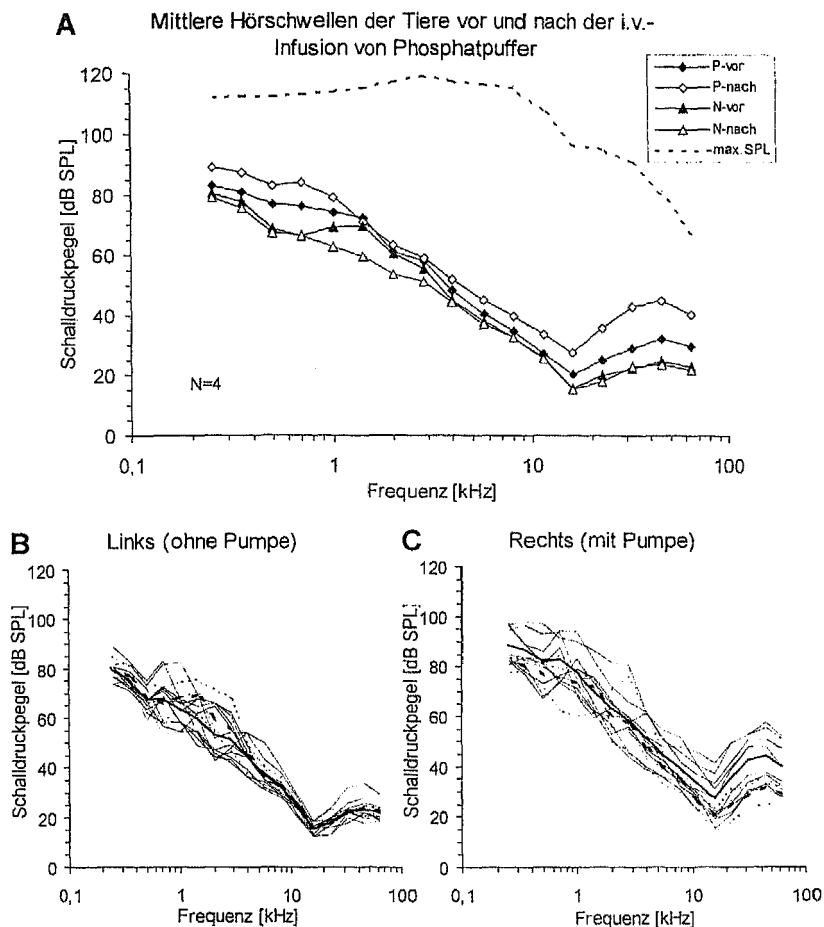


Abbildung 18. A. Die mittleren Hörschwellen der Tiere, die mit albumingefüllten Pumpen rechts implantiert wurden, vor und nach der i.v. Infusion von Phosphatpuffer. P steht für die mit Pumpe implantierte rechte Seite, N für die nicht implantierte linke Seite. Als "max. SPL" wird der maximale Schalldruckpegel des Systems bezeichnet.

In B und C sind die Originalhörschwellen dargestellt. Die punktierten Linien stehen für die Hörschwellen vor, die glatten für die Hörschwellen nach der Infusion von Phosphatpuffer. Die Mittelwerte sind als dicke Linien dargestellt.

Die Hörschwellen der implantierten Ohren hatten am 4.-32. Tag nach der PP-Infusion zusätzlich (im Bezug auf Tag 0) Verluste von 6,1 dB erwiesen. Die Differenz zwischen der linken und rechten Seite stieg im Laufe von 32 Tage nach der PP-Infusion auf 12,6 dB. Die stärksten Unterschiede gab es bei den Frequenzen oberhalb von 11 kHz (bis zu 21 dB bei 45,3 kHz) und unterhalb von 1,4 kHz (bis zu 11 dB bei 1 kHz).

3.2. Wirkung von NT-3

In weiteren Experimenten wurde untersucht, welche Wirkung NT-3 auf die durch 266 mg/kg Kanamycin und 30 mg/kg Ethakrynsäure ausgelösten Hörschwellenverluste ausübt. Die implantierten Mikropumpen waren mit NT-3- oder mit Albuminlösung ohne NT-3 gefüllt. Die Hörschwellen wurden am vierten Tag nach der Implantation, kurz vor der Infusion von Ototoxika (Tag 0) und an den Tagen 2-32 nach der Infusion gemessen.

3.2.1. Hörschwellen der mit Pumpen implantierten Ohren

In der Abbildung 19 sind die Hörschwellen der mit Pumpen implantierten Ohren dargestellt. Dadurch, daß die Ohren beider Tiergruppen (mit oder ohne NT-3) auf gleiche Art behandelt wurden, können die Unterschiede der Hörschwellen nur auf NT-3 in der Pumpenlösung zurückgeführt werden.

Es ist festzustellen, daß NT-3-behandelte Ohren bereits vor der Infusion der Ototoxika durchschnittlich um $3,6 \pm 1,9$ dB niedrigere Hörschwellen hatten, als die mit Albumin behandelten. Die größten Unterschiede gab es in den tiefen (0,25-2 kHz bis zu 6,5 dB) und hohen (22,6-64 kHz, bis zu 4,5 dB) Frequenzbereichen.

Die an den Tagen 4 bis 32 nach der Infusion der Ototoxika gemessenen Hörschwellen beider Gruppen hatten eine noch größere Differenz, welche durchschnittlich $8,6 \pm 2,9$ dB erreichte. Der Unterschied zwischen den Hörschwellen der mit NT-3 und mit Albumin behandelten Ohren war bei den höchsten Frequenzen (32-64 kHz) etwas schwächer ausgeprägt (2,7-5,3 dB).

Der zeitliche Verlauf der Hörschwellenverluste beider Tiergruppen an den implantierten Ohren war ziemlich homogen (s. Abbildungen 20 und 21). Bereits am zweiten Tag nach Infusion der Ototoxika waren die Hörverluste beinahe genauso stark, wie auch an den folgenden (4.-32.) Tagen. Der mittlere Unterschied zwischen Tag 2 und den Tagen 4-32 betrug $5,0 \pm 1,8$ dB bei den mit Albumin behandelten Ohren und $2,1 \pm 1,4$ dB bei den mit NT-3-beladenen.

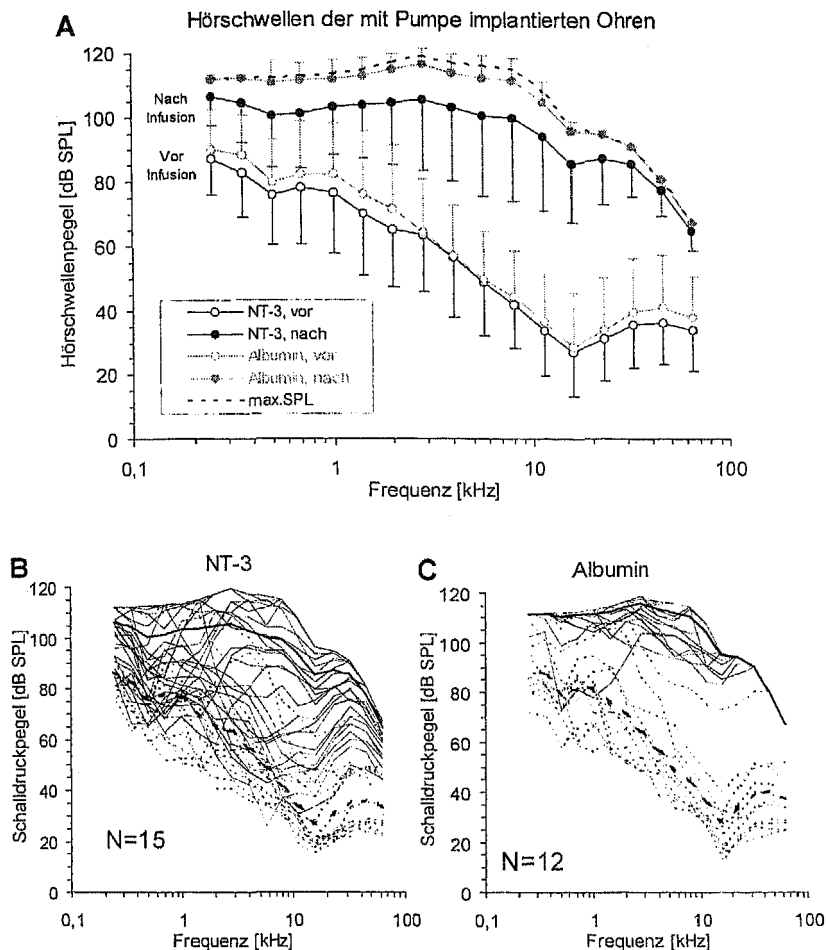


Abbildung 19. A. Die mittleren HörSchwellen der Ohren, die mit Albumin oder NT-3-Pumpen implantiert waren. "vor" steht für die HörSchwellen vor der Infusion der Ototoxika, "nach" für die HörSchwellen nach der Infusion. Standardabweichungen wurden von allen HörSchwellen aller Ohren der Gruppe berechnet. Als "max. SPL" wird der maximale Schalldruckpegel des Systems bezeichnet. In B und C sind die OriginalhörSchwellen dargestellt. Die punktierten Linien stehen für die HörSchwellen vor, die glatten für die HörSchwellen nach der Infusion der Ototoxika. Die Mittelwerte sind als dicke Linien dargestellt.

Zeitverlauf der mittleren Hörschwellenverluste der mit NT-3 behandelten Ohren nach der i.v. Infusion von Ototoxika

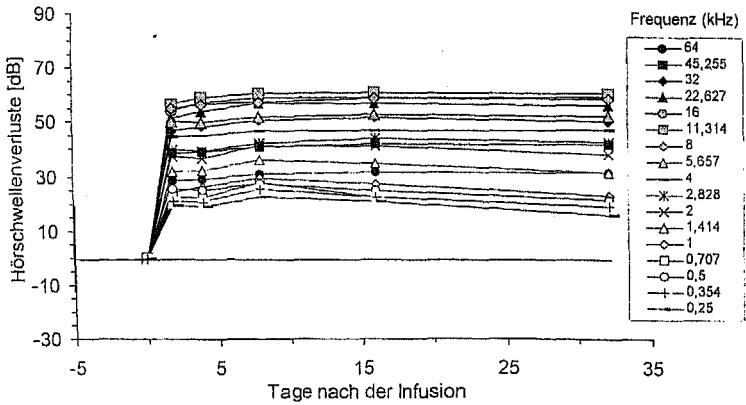


Abbildung 20. Zeitlicher Verlauf der mittleren Hörschwellenverluste aller Ohren, die mit NT-3-Pumpen implantiert waren. Die Ototoxika wurden am Tag 0 infundiert, gleich nach der Messung der Referenzhörschwelle. Jede einzelne Linie stellt den Verlust der Hörschwelle (in dB) bei einer bestimmten Frequenz dar.

Zeitverlauf der mittleren Hörschwellenverluste der mit Albumin behandelten Ohren nach der i.v. Infusion der Ototoxika

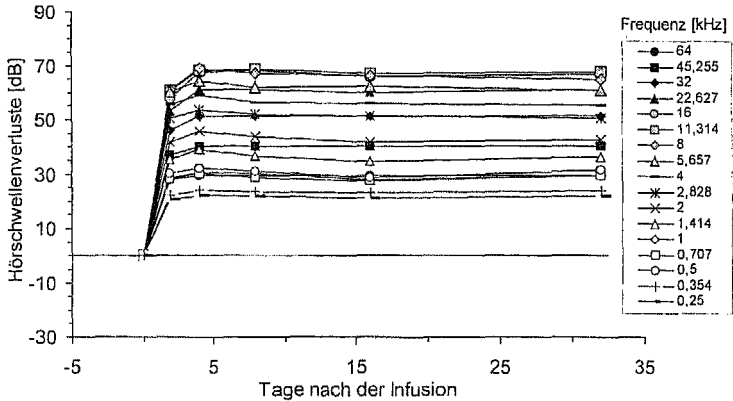


Abbildung 21. Zeitlicher Verlauf der mittleren Hörschwellenverluste aller Ohren, die mit Albumin-Pumpen implantiert waren. Die Ototoxika wurden am Tag 0 infundiert, gleich nach der Messung der Referenzhörschwelle. Jede einzelne Linie stellt den Verlust der Hörschwelle (in dB) bei einer bestimmten Frequenz dar.

3.2.2. Hörschwellen der nicht implantierten Ohren bei lokaler Applikation

Die mittleren Hörschwellen der linken Ohren (der rechts mit Katheter am runden Fenster implantierten Tieren) wurden auch untereinander verglichen (s. Abbildung 22). Die Hörschwellen der (kontralateral) mit NT-3 behandelten Ohren waren vor der Ototoxika-Behandlung um $5,4 \pm 2,9$ dB niedriger, als die Hörschwellen der kontralateral mit Albumin behandelten Ohren. Die stärksten Unterschiede der Hörschwellen lagen in tiefen (bis zu 10,4 dB bei 0,25-1,4 kHz) und höheren (bis zu 6,4 dB bei 16-64 kHz) Frequenzbereichen.

Nach der Infusion der Ototoxika verstärkte sich der Unterschied durchschnittlich bis auf $9,1 \pm 2,4$ dB. Die Differenz zwischen Hörschwellen der kontralateral mit NT-3 oder Albumin behandelten Ohren war nicht frequenzspezifisch.

Die zeitlichen Verläufe (s. Abbildungen 23 und 24) der Schwellenverluste waren an diesen Ohren homogen, die Hörschäden traten bereits am zweiten Tag nach der Infusion der Ototoxika ein und blieben bis zum 32. Tag stabil. Die Schwellenverluste und ihre Streuung waren bei den mit Albumin behandelten Tieren stärker.

Als die Unterschiede der Hörschwellen nicht implantierter Ohren zwischen den mit NT-3 und mit Albumin behandelten Tieren festgestellt wurden, wurde ein systemischer Effekt von NT-3 auch bei lokaler Applikationsart vermutet. Um diese Hypothese zu bestätigen oder zu widerlegen, wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt, bei der die Lösung in die zerebrospinale Flüssigkeit appliziert wurde.

3.2.3. Systemische Applikation von NT-3 oder Albumin

Hörschwellen der Tiere, die systemisch mit Albumin oder NT-3 behandelt wurden, wurden gemittelt. Die mittleren Hörschwellen der mit Albumin oder NT-3 behandelten Tiere wurden miteinander verglichen. Vor der Infusion der Ototoxika (am Tag 0) waren die Hörschwellen von den mit NT-3 und mit Albumin behandelten Tieren sehr ähnlich. Der in der Abbildung 25 dargestellte mittlere Unterschied betrug $0,1 \pm 1,4$ dB (die Hörschwellen der mit NT-3 behandelten Tiere waren niedriger).

In den 4-32 Tagen nach der Infusion der Ototoxika wurde ein Unterschied von durchschnittlich $5,2 \pm 2,5$ dB festgestellt. Sowohl der gesetzte Hörschaden als auch die Differenz zwischen den mittleren Hörschwellen der mit NT-3 oder Albumin behandelten Tiere waren frequenzspezifisch. Der Schwellenverlust nahm mit der Zunahme der Frequenz in beiden Tiergruppen zu. Die Differenz zwischen den Hörschwellen der mit NT-3 oder Albumin behandelten Tiere nahm mit der Abnahme der Frequenz zu.

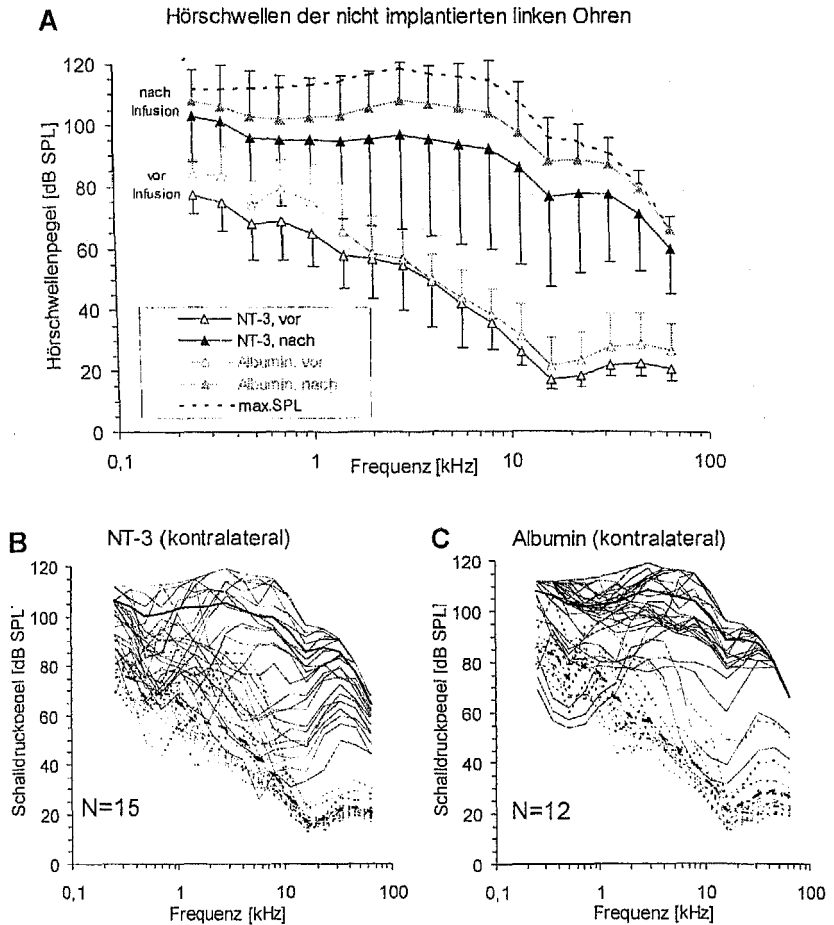


Abbildung 22. A. Die mittleren Hörschwellen der kontralateral zu den implantierten (linken) Ohren. "vor" steht für die Hörschwellen vor der Infusion de Ototoxika, "nach" für die Hörschwellen nach der Infusion. Standardabweichungen wurden von Hörschwellen aller Ohren der Gruppe berechnet. Als "max. SPL" wird der maximale Schalldruckpegel des Systems bezeichnet.

In B und C sind die Originalhörschwellen dargestellt. Die punktierten Linien stehen für die Hörschwellen vor, die glatten für die Hörschwellen nach der Infusion der Ototoxika. Die Mittelwerte sind als dicke Linien dargestellt.

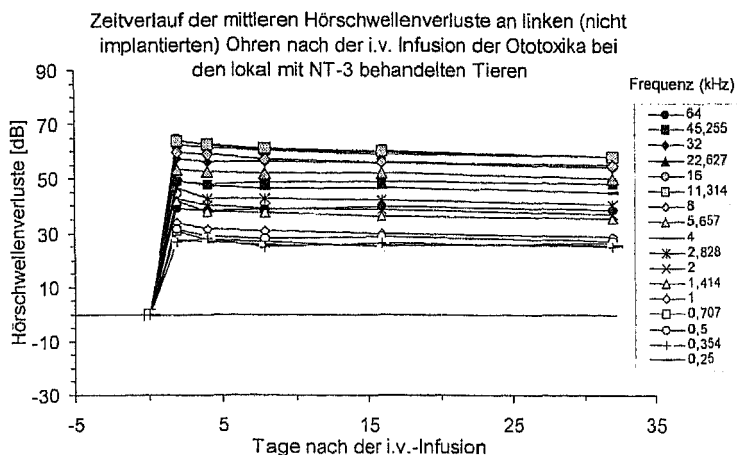


Abbildung 23. Zeitlicher Verlauf der mittleren Hörschwellenverluste der kontralateralen zu den mit NT-3-Pumpe implantierten (linken) Ohren. Die Ototoxika wurden am Tag 0 infundiert, gleich nach der Messung der Referenzhörschwelle. Jede einzelne Linie stellt den Verlust der Hörschwelle (in dB) bei einer bestimmten Frequenz dar.

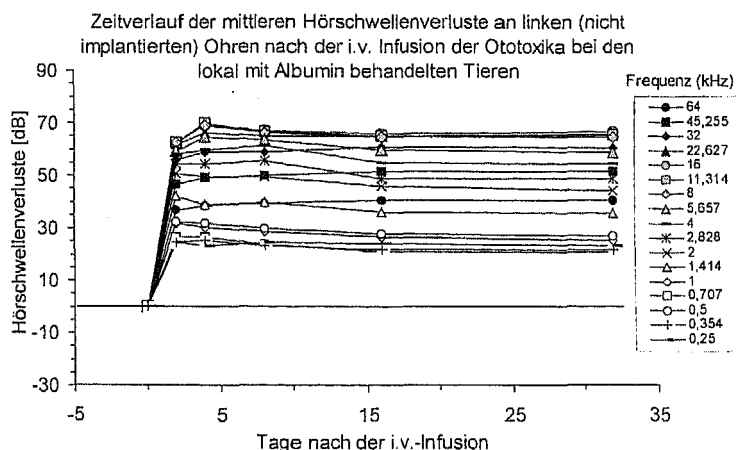


Abbildung 24. Zeitlicher Verlauf der mittleren Hörschwellenverluste der kontralateralen zu den mit Albumin-Pumpe implantierten (linken) Ohren. Die Ototoxika wurden am Tag 0 infundiert, gleich nach der Messung der Referenzhörschwelle. Jede einzelne Linie stellt den Verlust der Hörschwelle (in dB) bei einer bestimmten Frequenz dar.

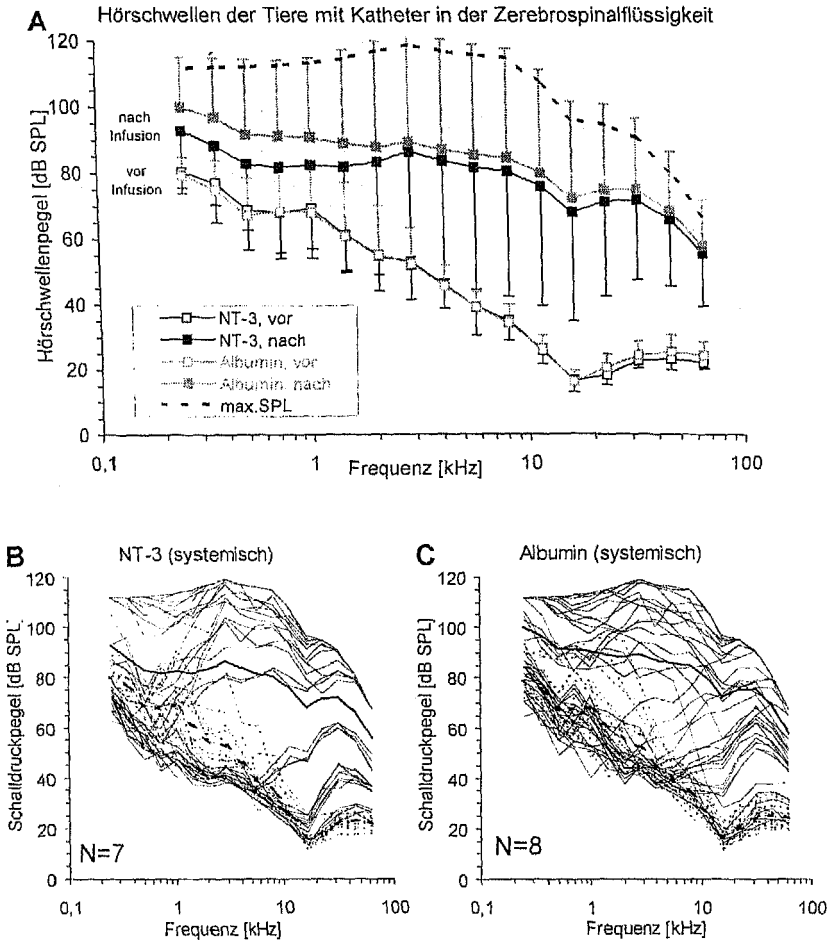


Abbildung 25. A. Die mittleren Hörschwellen beider Seiten von systemisch mit Albumin oder NT-3 behandelten Tier. "vor" steht für die Hörschwellen vor der Infusion de Ototoxika, "nach" für die Hörschwellen nach der Infusion. Standardabweichungen wurden von Hörschwellen aller Ohren einer Gruppe berechnet. Als "max. SPL" wird der maximale Schalldruckpegel des Systems bezeichnet. In **B** und **C** sind die Originalhörschwellen dargestellt. Punktierte Linien bedeuten die Hörschwellen vor, die dünnen glatten nach der Infusion der Ototoxika. Die Mittelwerte sind als dicke Linien dargestellt.

3.3. Protektive NT-3-Wirkung in Übersicht

Ergebnisse der physiologischen Versuche mit NT-3 können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

- durch die Infusion von Kanamycin und Ethakrynsäure wurden bei den lokal am Ohr mit der Pumpe implantierten Tieren Hörverluste von 46 dB induziert. NT-3 verringerte diese Schwellenverluste durchschnittlich um 5 dB.
- die am runden Fenster der Cochlea implantierten Pumpen erzeugten Hörverluste von durchschnittlich 5 dB. NT-3 wirkte auch gegen diese Verluste protektiv und verminderte sie um weitere 4 dB. NT-3 konnte also insgesamt eine Protektion von (5+4) 9 dB erzeugen.
- bei Tieren mit den in die Zerebrospinalflüssigkeit implantierten Pumpen wurde durch die Infusion der Ototoxika ein mittlerer Hörverlust von 38 dB induziert. NT-3 verminderte ihn um 5 dB.
- mit der Zunahme der Frequenz nahm die Stärke aller ototoxischen Hörverluste zu, die otoprotektive Wirkung von NT-3 ab.
- mit einer generellen Zunahme der Hörverluste bei allen Frequenzen (die lokal am Ohr behandelten Tiere hatten stärkere Hörverluste als die systemisch behandelten) nahm die Stärke der otoprotektiven NT-3-Wirkung zu.

4. Morphologische Ergebnisse

Die morphologische Untersuchung diente der Kontrolle der physiologischen Ergebnisse. Besonders in den Experimenten mit lokaler Applikation der Wachstumsfaktoren war es wichtig zu kontrollieren, ob die Hörverluste an den implantierten Ohren durch die Haarzellenverluste im Innenohr, durch pumpenbedingte Störungen im Mittelohr oder Verwachsungen in der *Scala tympani* zustande kamen. Eventuelle Schäden an den Neuronen des Spiralganglions konnten mit der gewählten Methode nicht erfaßt werden.

Es wurde festgestellt, daß die Streuung der morphologischen Schäden der Corti'schen Organe genauso stark war, wie auch die Hörschwellenverluste. Die Haarzellenverluste, die durch Kanamycin (133, 266 oder 400 mg/kg) mit 30 mg/kg Ethakrynsäure erzeugt wurden, konnten (wie auch die physiologischen Befunde) in drei Gruppen unterteilt werden. Keine, cochleotop (partielle) und totale Haarzellenverluste waren in jeder Gruppe vorhanden.

Ein quantitativer Vergleich der morphologischen Daten von zwei oder mehr Ohren wäre in zwei Fällen denkbar,

- Wenn die physiologischen Hörschwellen identisch sind, könnten die morphologischen Befunde untereinander verglichen werden. In diesem Fall würde das Ohr, welches stärkere morphologische Verluste aufweist, auf eine bessere Funktionsfähigkeit der erhaltenen Strukturen hinweisen.
- Bei identischen morphologischen Verlusten wurde das Ohr mit niedrigeren Hörschwellen auf eine bessere Übertragungs- oder Verarbeitungs- Funktion des Innenohres hindeuten.

Da es aber keine morphologisch identische Corti'sche Organe oder CAP-Hörschwellen gab, wurde die Analyse der mikroskopisch gewonnenen Daten nur auf eine qualitative Auswertung der einzelnen Ohren beschränkt.

4.1. Fallbeispiele

Keine oder totale Hörverluste.

Als die Corti'schen Organe der Tiere nach physiologischen Experimenten morphologisch untersucht wurden, wurde folgendes festgestellt:

1. Tiere mit totalen Hörverlusten hatten auch totale Haarzellenverluste in der Cochlea.
2. Cochleae mit intakten Corti'schen Organen hatten niedrige, nahe der „mittleren gesunden“ liegenden Hörschwellen (s. Ergebnisse, Abschnitt 1. Gesunde Hörschwellen).
3. Tiere mit niedrigen Hörschwellen hatten meist gesunde Corti'sche Organe.

Unseres Interesse galt insbesondere den Tieren mit partiellen Hörverlusten. In solchen Cochleae gab es, außer den totalen oder keinen Haarzellenverlusten, auch Bereiche mit partiell beschädigten Corti'schen Organen. Da aber kein quantitativer Vergleich einzelner Cochleae möglich ist, wurden die Haarzellen bei allen Tieren nicht gezählt, sondern die Cochleae in Umrissen beschrieben und die morphologischen Daten mit den physiologischen verglichen.

Ein geeignetes Beispiel stellt das linke Ohr eines Tieres, das mit einer Albumin-Pumpe (Katheter in der Zerebrospinalflüssigkeit) implantiert war und dessen Hörschwellen in der Abbildung 26 A dargestellt sind. Das Tier hatte am zweiten Tag nach der Infusion der Ototoxika Hörverluste in allen Frequenzbereichen. Die Hörschwellen in den tiefen Frequenzbereichen (unterhalb 4 kHz) wurden im Laufe von weiteren 30 Tagen niedriger und

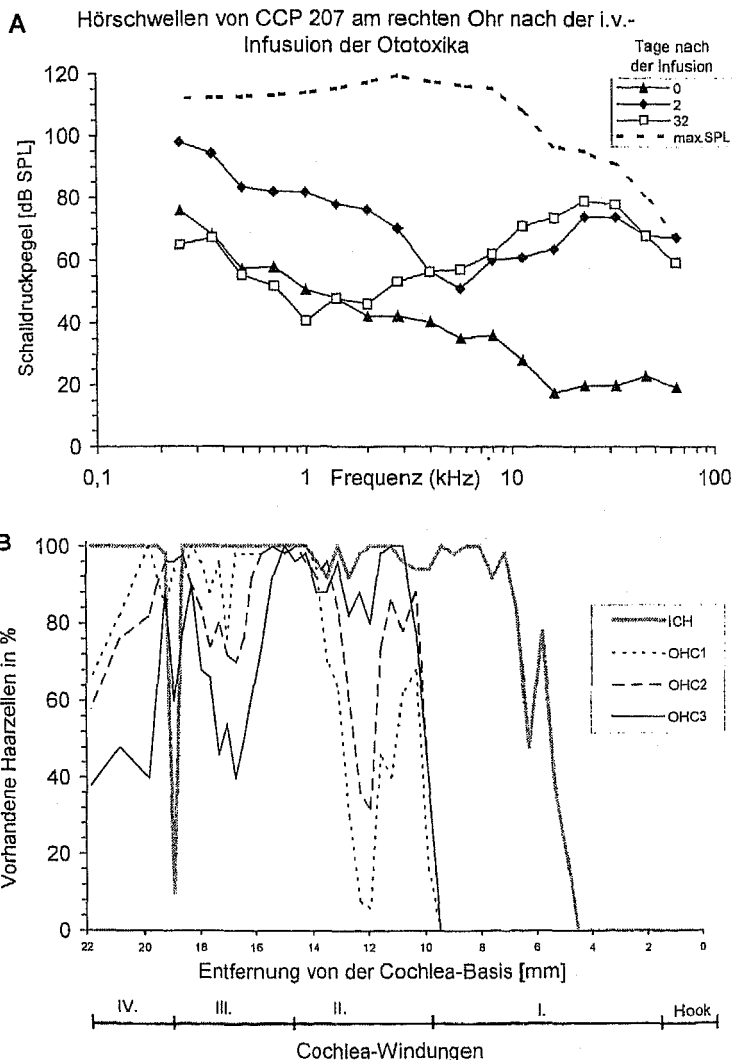


Abbildung 26 A. Hörschwellen des rechten Ohres vom systemisch mit Albumin behandelten Tieres nach der Infusion der Ototoxika. Als "max" wurde der maximale Schalldruckpegel des Systems bezeichnet.

Unten (**B**) ist das Cochleogramm desselben Ohres dargestellt. Die Anzahl der vorhandenen Haarzellen (in Prozent) sind gegen die Entfernung von der Cochlea-Basis aufgetragen. IHC-Innere, OHC-äußere Haarzellen (Reihen I, II und III wurden separat ausgewertet)

lagen am Tag 32 sogar unterhalb der Kontrollhörschwellen. Oberhalb 4 kHz wurde bis zum Experimentende ein zunehmender Hörschwellenverlust festgestellt.

Im untersten Cochleabereich war das ganze Corti'sche Organ samt den Stützzellen auf der Basillarmembran etwa 4 mm (entspricht Frequenzen oberhalb 25 kHz) degeneriert. Im Abschnitt von 4-6 mm von der Cochleabasis (6 mm entsprechen etwa 12 kHz) waren die zellulären Strukturen des Cortischen Organs auf der Basillarmembran 70% vorhanden. Weiter nach apikal auf der ganzen Länge der Basillarmembran war das Corti'sche Organ präsent. Ein Cochleogramm dieses Ohres wurde in der Abbildung 26 B dargestellt. Einzelne Abschnitte des Corti'schen Organs dieser Cochlea sind in Abbildung 27 zu sehen.

Die Cochleo- und tonotopen Angaben basieren auf den Frequenzkarten der cochleären Mikrophonpotentiale von Dallos (1975 und 1976). Festzustellen ist, daß im Bereich mit beschädigtem Corti'schen Organ (Oberhalb von 12 kHz) die Schwellenverluste 40-60 dB betrugen. Im Frequenzbereich der völligen Degeneration von OHCs (von 3 kHz und höher) erreichen die Schwellenverluste 12-27 dB. Eine weitere Feststellung war, daß geringe Schwellenverluste bei den Tieren mit implantierten Kathetern am runden Fenster auch mit einem moderaten Haarzellenverlust einher gingen.

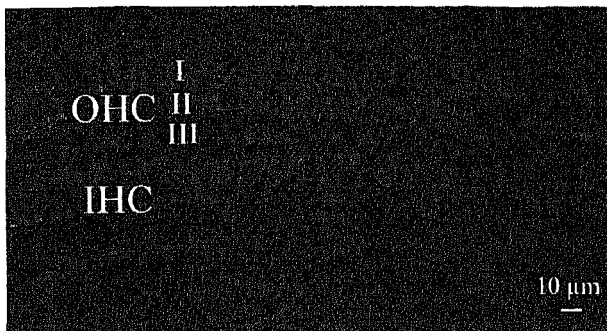


Abbildung 27 A. Fluoreszenzaufnahme des Corti'schen Organs etwa 21 mm von der Basis der Cochlea (vierte Windung, Frequenzbereich weit unter 0,25 kHz). 20% der äußeren Haarzellen (OHC) fehlen, die inneren Haarzellen (IHC) sind alle intakt. (Für die zugehörigen Hörschwellen siehe Abbildung 27, Beschreibung im Text).

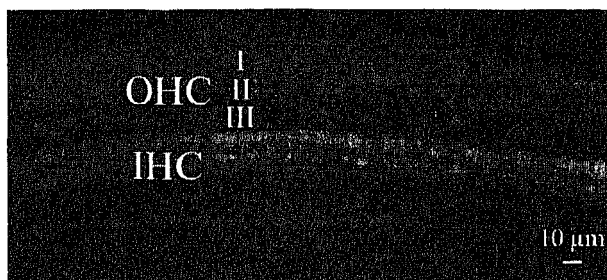


Abbildung 27 B. Fluoreszenzaufnahme des Corti'schen Organs etwa 10 mm von der Basis der Cochlea (erste Windung, Frequenzbereich etwa 4 kHz). Die inneren Haarzellen (IHC) sind alle vorhanden, 40% der äußeren (OHC) fehlen.

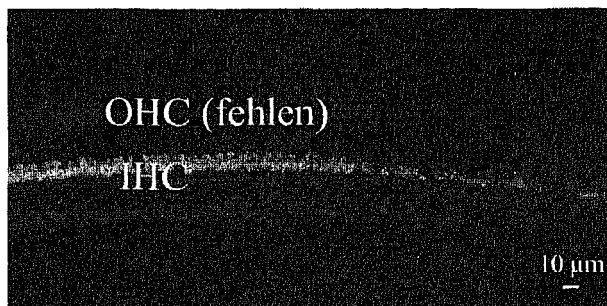


Abbildung 27 C. Fluoreszenzaufnahme des Corti'schen Organs etwa 6 mm von der Basis der Cochlea (erste Windung, Frequenzbereich etwa 8 kHz). Die inneren Haarzellen (IHC) sind alle noch vorhanden, die äußeren (OHC) fehlen aber ganz.

4.2. Allgemeine morphologische Befunde und ihre Korrelation mit physiologischen Ergebnissen

Da die Auswertung der morphologischen Ergebnisse bis jetzt nur auf Beschreibung einzelner Fälle beschränkt war, werden die Korrelate der morphologischen Daten mit den physiologischen Hörschwellen hier in einigen Punkten zusammengefaßt.

In den mehr als 40 histologisch ausgewerteten Cochleae konnten folgende allgemein gültigen Regelmäßigkeiten festgestellt und in folgenden Punkten zusammengefaßt werden:

- ein totaler Verlust aller Haarzellen wurde nur bei den Cochleae mit totalem Schwellenverlust gefunden.
- die Cochleae mit allen oder beinahe allen vorhandenen Haarzellen hatten immer niedrige Hörschwellen, die nah der „mittleren gesunden“ Hörschwelle waren.
- geringe Schäden der Haarzellen (z.B. ihr sporadischer Verlust von 1-4 Zellen am Stück bis zu 10% der gesamten inneren oder 30% der äußeren Haarzellen) hatten keine signifikanten Schwellenverluste zur Folge.
- Verluste aller OHCs bedingen Schwellenverluste bis zu 50 dB.
- bei Haarzellenverlusten in basalen Cochleabereichen und weiter apikal liegendem gesundem Corti'schen Organ wurde kein totaler Hörverlust in den hohen Frequenzbereichen festgestellt.
- ein totaler Verlust der IHC (unabhängig von den OHCs) bedingt auch völligen Verlust der CAPs.
- apikal liegende äußere ohne innere Haarzellen spielen keine Rolle für die CAPs.

Diskussion

1. Meerschweinchen als Versuchstiere. Chirurgische Eingriffe

Dadurch, daß in unseren Versuchen weibliche bunte Meerschweinchen eingesetzt wurden, konnten die Ergebnisse der Experimente mit Daten anderer Arbeitsgruppen gut verglichen werden. Von den pigmentierten nur die sandfarbenen Tiere erwiesen bei der Narkose öfters Zwischenfälle und waren deshalb für die Experimente weniger geeignet.

Die größeren chirurgischen Eingriffe wurden unter sterilen Bedingungen vorgenommen. Solche Bedingungen benutzen auch andere Arbeitsgruppen, die Mikropumpen in Meerschweinchen implantieren (Brown et al., 1993; Prieskorn und Miller, 2000). Anwendung von Metronidazol während der Operation erwies sich als sehr effektiv und nebenwirkungslos. Eine Anwendung von Antibiotika oder Antiseptika während solcher Operationen am Meerschweinchen wurde in der Literatur nicht beschrieben.

2. Hörschädigung der Meerschweinchen durch die intravenöse Applikation von Kanamycin und Ethakrynsäure

Für die Ertaubung der Meerschweinchen wurde in unseren Experimenten die Methode (von West et al., 1973) der Infusion von Kanamycin und Ethakrynsäure modifiziert. Außer einer hohen Zuverlässigkeit und garantierter Bioverfügbarkeit durch die intravenöse Gabe beider Stoffe wurde auch eine minimale Belastung der Tiere erzielt (Sudavicius et al., 1997).

Die Ergebnisse der Dosis-Wirkungs-Untersuchung haben ergeben, daß 133-400 mg/kg Kanamycin mit 0-20 mg/kg Ethakrynsäure keine dauerhaften Hörverluste hervorrufen. Durch Erhöhen der Dosis von Ethakrynsäure auf 30 mg/kg wurden durchschnittlich partielle Hörschäden, und mit 40 mg/kg totale Hörverluste ausgelöst.

Das Dosis-Wirkungs-Verhältnis weist auf schmale therapeutische Breite dieser Kombination hin, welche partielle Hörverluste auslöst. Die Veränderungen der mittleren Schwellenverluste mit der Änderung der Dosierung von Ototoxika kamen aber nicht durch eine Veränderung der Hörverluste aller Tiere zustande. Vielmehr änderte sich die Anzahl der stark, partiell und nicht hörgeschädigten Tiere. Trotzdem ist zu bemerken, daß die meisten partiellen Hörschwellenverluste durch Dosierungskombination von 266 mg/kg Kanamycin mit 30 mg/kg Ethakrynsäure ausgelöst wurden. Aus diesem Grund wurde diese

Dosierungskombination in den Versuchen mit NT-3 eingesetzt.

Eine mehrtägige subcutane Applikation von Gentamicin (Garetz et al., 1994: 14 Tage 100 mg/kg Gentamicin; Scha und Schacht, 2000: 19 Tage 120 mg/kg Gentamicin) induziert Hörschwellenverluste, die sich über vier Tage entwickeln, bis sie ihre endgültige Stärke erreichen. Ein ähnlicher Zeitverlauf in der von uns entwickelten akuten Hörschädigungsmethode könnte bedeuten, daß die Mechanismen der Schandensentstehung ähnlich oder sogar identisch sind. Es wäre daher interessant zu untersuchen, ob Radikalfänger oder Eischelatoren auch vor einem akuten ototoxischen Schaden durch Kombinationen von Aminoglykosiden und Schleifendiuretika schützen können.

Andere in der Literatur beschriebenen Hörschädigungsmethoden zeigen das gleiche Problem der starken Hörverluststreuung, sowohl in Versuchen mit Aminoglykosiden (Beaubien et al., 1995), Cisplatin (Heijmen et al., 1999), als auch bei akustischer Schädigung (Yamasoba et al., 1999). Eine Ursache für die starke Streuung bei allen bis jetzt angewandten Methoden könnte die genetische Prädisposition (Cortopassi und Hutchin 1994; Lehnhardt 1984) als auch die allgemeine körperliche Verfassung der Tiere zum Zeitpunkt der Hörschädigung sein (s. auch Kapitel 3. Effekte der implantierten Pumpen)

3. Effekte der implantierten Pumpen

Durch die am runden Fenster der Cochlea implantierten Pumpen wurden Schwellenverluste im Mittel von 4,5 dB ausgelöst, die in weiteren 32 Tagen um 8 dB zunahmen. Dies zeigte, daß die Pumpen alleine einen leicht progredierenden Hörverlust bewirken.

Die ototoxischen Hörverluste der mit einer Pumpe am runden Fenster implantierten Tiere waren beiderseits stärker, als bei Tieren, deren Pumpenlösung in die zerebrospinale Flüssigkeit appliziert wurde. Unterschiede der Schwellenverluste zwischen den lokal und den systemisch behandelten Tieren betrugen durchschnittlich 10 dB in der NT-3- und 8 dB in der albuminbehandelten Tiergruppen.

Tiere mit weniger strapazierenden Pumpen in der Zerebrospinalflüssigkeit hatten geringere mittlere Verluste, als die am Ohr behandelten. Daraus kann geschlossen werden, daß auch die allgemeine körperliche Verfassung der Tiere die Stärke des ototoxischen Schadens

bedingte. Auf beiden Seiten bestand eine Differenz zwischen den systemisch und lokal behandelten Tieren, obwohl die Pumpen nur auf der rechten Seite implantiert waren.

Die These, daß die Pumpen und die Katheterposition für höhere Hörverluste durch Ototoxika verantwortlich sind, wird auch durch folgende Tatsache unterstützt. In den Ototoxizitätsversuchen (mit Tieren ohne Pumpen) wurden mit gleicher Ototoxika-Dosierung ein um 9 dB geringerer mittlerer Hörverlust ausgelöst, als bei den am geringsten hörgeschädigten Tieren mit einer Pumpe (systemisch NT-3-behandelte).

3.1. Hörverluste durch die extracochleären Pumpen

Eine Verminderung der pumpenbedingten Hörverluste durch NT-3 deutet auf den intracochleären Charakter dieser Verluste hin. Die Hypothese, daß die Schwellenverluste intracochleären Charakters sind und durch NT-3 vermindert werden könnten, wird durch die Tatsache unterstützt, daß bei den Tieren mit pumpenbedingten Schäden auch Haarzellenverluste beobachtet wurden.

Auf die Membran des runden Fensters applizierter GDNF vermindert die durch Aminoglykoside induzierten Schäden (Park et al., 1998). Weder diese noch andere Autoren berichteten aber über die Schwellenverluste, die durch die Implantation der Pumpe oder Applikation der Pumpenlösung ausgelöst wurden.

3.2. Katheter und ihre Endstücke

Das von Kingma (et al., 1992) beschriebene Implantations- und Behandlungssystem für osmotische ALZET-Mikropumpen wurde aus einem Polyurethankatheter und Teflonspitze hergestellt. Später wurde es von Prieskorn und Miller (2000) modifiziert. Der Katheter wurde aus Vinylschlauch gebaut und mit Endstück aus Polyimid versehen. Die beiden Teile wurden mit Silikonkleber verklebt. Ein aufgesetzter Tropfen Silikonkleber verhinderte zu tiefes Eindringen der Katheterspitze in die Cochlea.

Nachteile dieser beiden Methoden waren, daß Katheterendstück in der Cochlea nur durch mechanische Spannungskraft des Katheters gehalten wurden. Ein dichtes Zuschließen der Öffnung in die *Scala tympani* war dadurch nicht möglich. Ein weiterer Nachteil, gegenüber unserem Silikonkatheter, ist die unspezifische Proteinaffinität von Vinyl und Polyimid.

Das von uns eingesetzte Silikon (Katheter) ist sehr hydrophil und besitzt nur minimale unspezifische Proteinbindung. Ein weiterer Vorteil unseres Katheters (samt der Teflonspitze) ist seine Autoklavierbarkeit bei 141°C, was eine zuverlässige Sterilisation erheblich

erleichtert. Die mechanische Strapazierbarkeit und Dehnbarkeit von Silikon ist kaum zu übertreffen. Kleberlose Befestigung der Katheterspitze am Silikonschlauch, die trotzdem eine Dichte und starke mechanische Haftung garantierte, waren weitere Vorteile unseres Katheters.

4. Protektive Wirkung von NT-3 auf die Hörschwellen

Diese Experimente haben gezeigt, daß die mittleren Hörschwellen und ihre Verluste bei den NT-3-behandelten Tieren in allen Tiergruppen niedriger waren, als die der albuminbehandelten Tiere. Dies deutet darauf hin, daß NT-3 eine protektive Wirkung gegen akute Hörschädigung durch Kanamycin und Ethakrynsäure bewirkt. Allerdings brachte NT-3 eine Verminderung der Schwellenverluste durchschnittlich um 9 dB bei lokaler und 5 dB bei systemischer Behandlung. In Betracht der ototoxisch induzierten Schwellenverluste von 40-47 dB bei lokal und 33-38 dB bei systemisch mit Pumpe behandelten Tieren ist der otoprotektive NT-3-Effekt bei der verwendeten hohen Ototoxika-Dosis insgesamt als gering anzusehen.

Weiterhin wurde festgestellt:

- Die protektive Wirkung von NT-3 nahm mit der Zunahme der Frequenz ab
- NT-3 verbesserte die Hörschwellen gesunder Ohren nicht
- Stärke und Art der protektiven Wirkung waren bei der lokal am Ohr und der in die Zerebrospinalflüssigkeit applizierten NT-3-Lösung gleich stark.

4.1. Physiologischer otoprotektiver Effekt durch lokal applizierten NT-3

Die protektive Wirkung von NT-3 wurde durch Hörschwellenvergleich der NT-3- mit den albuminbehandelten Tiere ermittelt. Alle mit einer Pumpe am Ohr implantierten Tiere wurden identisch behandelt. Der einzige Unterschied zwischen den Tiergruppen bestand im Inhalt der Pumpen (mit oder ohne NT-3). Deshalb sind die Unterschiede in den Hörschwellen oder den morphologischen Befunden zwischen den Tiergruppen auf NT-3 zurückzuführen.

4.1.1. Protektion gegen einen gesetzten Hörschaden

In den Tagen 4-32 nach der Infusion der Ototoxika erreichte die mittlere Differenz zwischen den Hörschwellen der NT-3- und albuminbehandelten Ohren 8,6 dB.

Hörverluste der am runden Fenster mit NT-3 oder Albumin behandelten Tieren

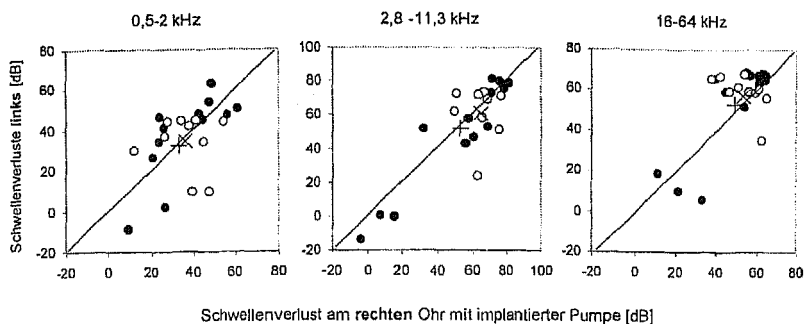


Abbildung 28. Hörverluste der rechts mit Katheter implantierten Tiere an den Tagen 4-32 nach der Ototoxika-Infusion im Vergleich zu Hörschwellen vor der Infusion der Ototoxika in drei Frequenzbereichen. Die ausgefüllten Symbole ● stehen für NT-3-behandelte Tiere (n=15), die leeren Symbole ○ für die albuminbehandelten (n=13). Die Mittelwerte sind als + für NT-3- und x für albuminbehandelte Tiere dargestellt.

Da die Hörverluste aber nicht normalverteilt waren, wurden sie in Abbildung 28 mit der von Keithley (et al., 1998) angewandten Methode dargestellt: die Schwellenverluste auf beiden Seiten wurden gegeneinander aufgetragen. Um die Frequenzspezifität der Hörverluste zu zeigen, wurden die Werte für drei Frequenzbereiche (0,5-2 kHz, 2,8-11,3 kHz und 16-64 kHz) separat dargestellt. Zusätzlich zu den Originaldaten einzelner Tiere wurden auch Mittelwerte abgebildet. Die Ergebnisse sind folgendermaßen zu interpretieren:

- Durch die Infusion der Ototoxika wurden etwa gleich starke Hörverluste auf beiden Seiten gesetzt
- Die Schwellenverluste der nur mit Albumin (ohne NT-3) behandelten Tiere waren weniger gestreut und waren durchschnittlich stärker, insbesondere im mittleren Frequenzbereich
- Die im durchschnitt niedrigeren Schwellenverluste der NT-3-behandelten Gruppe wurden hauptsächlich durch drei Tiere (von 15) bedingt, die keine oder nur sehr geringe Verluste hatten
- Die nicht oder nur gering hörgeschädigten NT-3-behandelten Tiere hatten auf der rechten Seite stärkere Verluste, die durch die Pumpe nach der Infusion der Ototoxika verursacht

wurden (siehe auch Diskussion, Abschnitt 3.1. „Hörverluste durch die extracochleären Pumpen“)

- Die stärksten Schwellenverluste der NT-3-behandelten Tiere waren höher, als die maximalen Verluste der Albumintiere. Dies wurde dadurch bedingt, daß die Hörschwellen der albuminbehandelten Tiere bereits vor der Ototoxika-Infusion höher waren, als die der NT-3-behandelten Tiere. Dadurch konnten die albuminbehandelten Tiere, die „total hörgeschädigt“ wurden, „weniger“ (bis zur maximalen Schalleistung des Systems) verlieren, als die besser hörenden NT-3-behandelten Tiere.
- Die Protektion durch NT-3 war frequenzspezifisch und nicht von der Stärke der Hörverluste abhängig. Bei den tiefen Frequenzen war die schützende Wirkung stärker ausgeprägt, als bei den hohen.

In der von Keithley (et al., 1998) publizierten Arbeit wurde GDNF-Lösung einmalig auf das runde Fenster appliziert und die Tiere einem akustischen Trauma ausgesetzt. Die gemessenen ABR-Schwellenverluste waren bei den GDNF behandelten Tieren durchschnittlich um 5 dB geringer (die mittleren Schwellenverluste der Kontrolliere waren 15 dB). Es ist aber festzustellen, daß die Ergebnisse auch nicht durch generelle Verminderung der Schwellenverluste zustande kamen, sondern durch die Veränderung der Anzahl der stark und schwach hörgeschädigten Tiere.

Im Experiment von Shoji (et al., 2000) wurde GDNF vor und nach einem akustischen Schaden intracochleär appliziert. Der physiologische otoprotektive Effekt wurde mit 100 ng/ml 0,5 µl/h GDNF gefunden, aber nicht mit höherer oder geringerer Dosierung. GDNF verminderte die Verluste (siehe auch Keithley et al., 1998) um 5 dB bei einer Tieranzahl von fünf. Da es aber nur einmal gemessen wurde (am zwölften Tag nach der Pumpenimplantation und am siebten Tag nach der Beschallung), kann weder Zeitverlauf der Schwellenverluste, noch die natürliche Schwankung der Schwellen einzelner Ohren zwischen den Tagen berücksichtigt werden.

Diese beiden Referenzen zeigen, daß sowohl an die Membran des runden Fensters, als auch in die *Scala tympani* applizierter GDNF gleich starke protektive Wirkung gegen akustischen Trauma verleite. Weil die GDNF-Konzentrationen nach der Applikation in der Cochlea unbekannt blieb, können die Dosierungen nicht verglichen werden. Trotzdem kann vermutet werden, daß sowohl NT-3 (Molekulargewicht 27,2 kDa) als auch GDNF (30 kDa) auch bei der Applikation auf die Membran des runden Fensters der Cochlea in die *Scala*

tympani gelangen. Es wird durch die Tatsache unterstützt, daß diese Membran bei Meerschweinchen für Albumin und Latexkügelchen bis zu einem Durchmesser von 1µm permeabel ist (Übersicht bei Goycoolea und Lundman, 1997).

Unbekannt bleibt auch die notwendige Behandlungsdauer mit Wachstumsfaktoren, die hörschützende Wirkung ausübt. Die chronische Behandlung bei Schoji (et al. 2000) und einmalige Gabe bei Keithley (et al., 1998) hatten vergleichbar ähnliche Effekte.

Park (et al., 1998) hat GDNF auf die Membran des runden Fensters mit einer Mikropumpe gegeben. GDNF hatte keine Wirkung gegen einen akuten ototoxischen Schaden durch Kanamycin und Ethakrynsäure. Allerdings, gab es eine Verminderung der Schwellenverluste (durchschnittlich um 9 dB, was mit NT-3-Effekt in unserem Experiment identisch ist), wenn Hörverluste durch mehrtägige Applikation von Gentamicin ausgelöst wurden. Wenn NT-3 aber nicht GDNF gegen akute ototoxische Schäden wirksam wäre, könnte dies auf einen Unterschied in der Wirkungsart von NT-3 und GDNF hindeuten. Die Protektion gegen einen Schaden durch chronisch applizierten Gentamicin ist durchaus mit dem Effekt gegen akuten Schaden durch Kanamycin und Ethakrynsäure vergleichbar.

Yagi (et al., 1999) beschreibt Experimente, in denen GDNF-Produktion durch die in die Cochlea eingeführten Adenoviren induziert wurde. Vier Tage nach der Applikation der Adenoviren wurden die Tiere mit Kanamycin und Ethakrynsäure vertäubt. Zwischen den Ohren, die mit Vektoren mit dem GDNF- oder dem β -Galaktosidase-Gen inokuliert wurden, wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Nichts desto trotz, in den Ohren mit applizierten GDNF-Vektoren wurden um 12-18 dB geringere Schwellenverluste induziert, als in den mit Galaktosidase-cDNA behandelten Ohren. Die protektive Wirkung nahm mit der Abnahme der Schadenstärke zu und ist mit den hier beschriebenen Ergebnissen vergleichbar. Es kann aber vermutet werden, daß die Verbindung zwischen der Schadenstärke und der Protektion nur sekundär ist.

Die These, daß Protektion und die Schadenstärke miteinander verbunden sind, wird durch folgenden Befund unserer Arbeit widerlegt. Innerhalb *einer Gruppe* (systemisch oder lokal behandelt) war der Satz „je stärker der Schaden, desto schwächer die Protektion“ gültig. Bei einer Zunahme des Hörschadens bei *einer bestimmten Frequenz* zwischen den Gruppen (die lokal behandelten Tiere hatten stärkere Hörverluste als die systemisch behandelten) nahm die Stärke der Protektion aber zu. Die Protektion kann also nur mit Frequenz verbunden werden.

Mittlere Hörschwellen der GDNF behandelten Ohren wurden in dem Experiment von Yagi et al. (1999) aus zehn Tieren (je eine ABR-Hörschwelle) gebildet. Zwei von den zehn

gleich behandelten Tieren hatten bei allen Frequenzen geringere Schwellenverluste als 20 dB, die anderen acht - über 40 dB. Die Streuung der Hörverluste der drei Kontrolltiere war nicht geringer, als die der GDNF-behandelten. Die mittleren Schwellenverluste wurden in diesem Fall auch durch die Anzahl der sehr stark, schwach oder gar nicht hörgeschädigten Tiere bestimmt.

In *in vivo* Experimenten mit anderen Wachstumsfaktoren, z. B. BDNF oder NT-3, wurden die Meerschweinchen nur histologisch untersucht (Ruan et al., 1999). Nach der Implantation der Pumpen wurden die Tiere mit fünf i.p. Injektionen von Kanamycin (an fünf nacheinander folgenden Tagen, je 400 mg/kg) hörgeschädigt. Eine 60-tägige NT-3-Infusion in die *Scala tympani* (100 µg/ml, 0,25 µl/h) hat die Anzahl der überlebenden inneren Haarzellen an den Tagen 30 und 60, nicht aber am Tag 15 erhöht. Die Anzahl der äußeren Haarzellen wurde durch diese Behandlung nur am Tag 60 nach dem Behandlungsbeginn erhöht. Gleiche Behandlung mit BDNF hatte nur die Verluste der inneren Haarzellen und nur am Tag 30 verringert. Durch die gefundenen Unterschiede an diesen Tagen wurde die Anzahldifferenz der abgestorbenen Haarzellen berechnet. Regeneration der Haarzellen in der Cochlea der Säugetiere *in vivo* wurde nicht beobachtet.

In unseren Versuchen wurde die protektive NT-3-Wirkung bereits am vierten Tag nach Behandlungsbeginn festgestellt. Wenn die Veränderung der Anzahl von Haarzellen erst am 15. Tag nach der Schädigung auftritt (Ruan et al., 1999), könnte eine Diskrepanz zwischen Histologie und hier beschriebener Physiologie festgestellt werden. Die histologischen Daten sind kritisch zu bewerten, weil die Verluste von Haarzellen an den NT-3-behandelten Ohren am Tag 15 noch stärker als bei den Kontrolltieren waren. Sie weisen auf eine starke Streuung der Ergebnisse im beschriebenen Versuch hin.

4.1.2. Protektion gegen die durch Pumpen ausgelösten Hörverluste

Bereits vor der Infusion der Ototoxika wurde in unserem Experiment ein Unterschied zwischen den Hörschwellen der NT-3- und albuminbehandelten Ohren festgestellt. Die NT-3-behandelten Ohren hatten bei allen Frequenzen durchschnittlich um 3,6 dB niedrigere Hörschwellen. Am stärksten war die Differenz bei tiefen und hohen Frequenzen. Sie entsprach den Frequenzbereichen, in denen die durch Pumpen bedingten Schwellenverluste auch bei unseren Kontrolltieren festgestellt wurden.

Daraus ist zu schließen, daß NT-3 auch die durch die Pumpe und Applikation der Pumpenlösung verursachten Schwellenverluste mindert. Weil die anderen Arbeitsgruppen

keine Schwellenverluste durch die Pumpen gesehen haben, wurde eine derartige protektive Wirkung der Wachstumsfaktoren in der Literatur noch nicht beschrieben. Ruan et al. (1999) beschrieben zwar die durch implantierte Pumpen induzierte Bildung von Bindegewebe in der *Scala tympani*, untersuchte jedoch nicht die daraus resultierenden Hörverluste.

4.2. Bilaterale Wirkung von NT-3

Der Befund, daß lokal an einem Ohr applizierter NT-3 eine protektive Wirkung auch auf der kontralateralen Seite hat, war überraschend, aber nicht unerwartet. Um 9,1 dB geringere Schwellenverluste der kontralateral mit NT-3 behandelten Ohren (auf der behandelten, ipsilateralen Seite wurde eine Differenz von 8,6 dB festgestellt) zeigte etwa gleich starke NT-3-Otoprotektion beiderseits.

Die weiteren Experimente mit dem in die Zerebrospinalflüssigkeit applizierten NT-3 haben die systemische otoprotektive Wirkung (von 5,6 dB) dieses Wachstumsfaktors bestätigt. Sollte die Protektion durch lokale NT-3-Wirkung an Haarzellen oder Neuronen des Spiralganglions zustande kommen, so bleibt der Mechanismus, wie NT-3 auf die kontralaterale Seite gelingt, ungeklärt.

4.2.1. Kontralaterale Wirkung von NT-3

Die kontralaterale wie auch die ipsilaterale Otoprotektion gegen Kanamycin und Ethakrynsäure durch NT-3 haben einen qualitativen Charakter (es änderte die Proportion der stark und gering hörgeschädigten Tiere). Die besser nach der Hörschädigung hörenden Tiere hatten meistens auf beiden Seiten niedrigere Hörschwellen.

Die NT-3-Konzentration der kontralateralen Seite konnte nur einen Bruchteil der Konzentration und der Aktivität der ipsilateralen Seite betragen. Eine Translokation des Wirkstoffes ist immer mit Konzentrationsverlusten verbunden. Die Tatsache, daß NT-3 auf beiden Seiten fast gleich stark otoprotektiv wirkte, deutet darauf hin, daß hier bereits die maximal mögliche Wirkung erreicht wurde, sonst sollte die niedrigere Konzentration kontralateral auch eine geringere Wirkung zeigen.

Ähnliche kontralaterale Effekte haben auch andere Arbeitsgruppen festgestellt. Shoji et al. (2000) fanden, daß intracochleär applizierter GDNF (100 ng/ml 0,5 µl/h) beiderseits otoprotektiv wirkt, jedoch ipsilateral stärker (6 dB) als kontralateral (3 dB). Die Protektion wurde im Vergleich zu den Tieren errechnet, die nur ein Zehntel der GDNF-Menge erhielten. Wegen dieser Differenz auf beiden Seiten können hier zwei Möglichkeiten diskutiert werden:

- durch die gegebene Dosierung wurde die maximale protektive Wirkung von GDNF kontralateral nicht erreicht
- eine schmale therapeutische Breite von GDNF (wenn die geringere Konzentration kontralateral nur geringe Effekte auslöste, aber ipsilateral bereits maximale Protektion erreicht hatte).

4.2.1.1. Verstärkung der ototoxischen Hörverluste durch neurotrophe Faktoren

Der von Shoji et al. (1998) gefundene potenzierende ototoxische Effekt von hoher GDNF-Konzentration (1 µg/ml, 0,5 µl/h) hatte ebenso eine kontralaterale Wirkung. Durch hoch dosierten GDNF wurde der durch Beschallung ausgelöste Hörverlust beiderseits höher. Die kontralateral eventuell niedrigere GDNF-Aktivität verstärkte den akustisch ausgelösten Hörverlust geringer (um 2 dB) als ipsilateral (um 5 dB).

In unserem Fall wurde jedoch die Dosisabhängigkeit der NT-3-Otoprotektion nicht untersucht. Da die Effekte in unseren Experimenten beidseitig fast gleich waren, bei vermutlich ipsilateral viel höherer NT-3-Aktivität als kontralateral, ist eine additive Toxizität von NT-3 eher unwahrscheinlich.

4.2.1.2. Wirkung der durch virale Vektoren transduzierten Wachstumsfaktoren

Auch in GDNF-Transferversuchen mit viralen Vektoren wurden kontralaterale Effekte beobachtet. Genprodukte vom adenoassoziierten Gentransfer in eine Cochlea wurden auch in der unbehandelten kontralateralen Cochlea gefunden (Lawani et al., 1997, Pettis et al., 1998). Stöver et al. (2000b) haben auch Produkte der durch Adenovirus eingeführten cDNA in der kontralateralen Cochlea festgestellt.

Im Experiment von Yagi und Mitarbeitern (1999) hatten die Adenovektoren neben GDNF- auch ein Markergen. Obwohl die GDNF-behandelten Tiere auch auf der kontralateralen Seite eine protektive Wirkung gegen akustische Schädigung vorwiesen, wurden Produkte des Markergens nur ipsilateral gefunden.

So kann es vermutet werden, daß auf die kontralaterale Seite nur GDNF aber nicht die Vektoren gelangen. Es wird eine Wachstumsfaktor-Translokation durch die offene Verbindung der cochleären Perilymphe und des Zerebrospinalraumes (Salt und Thalmann, 1988) diskutiert.

Kaupp und Giebel (1980) haben die cochleären Ströme in der basalen Windung der *Scala tympani* bei Meerschweinchen untersucht und festgestellt, daß sie zum Subarachnoidalraum

ziehen und dann in der Zerebrospinalflüssigkeit münden. Damit könnte ein Transfer der Wachstumsfaktoren oder der viralen Vektoren aus der Cochlea in die Zerebrospinalflüssigkeit untermauert werden, allerdings *nicht der Transfer in die kontralaterale Cochlea*.

Als weitere mögliche Hypothese für die kontralateralen Effekte, die auch den Wirkungsmechanismus von otoprotektiven Wachstumsfaktoren deutet, wird eine erhöhte neuronale Aktivität der Afferenzen diskutiert (Yagi et al., 1999, Shoji et al., 2000). Die erhöhte Aktivität könnte durch die kontralateralen Verschaltungen auch auf der Gegenseite protektiv wirken, wie z.B. die Reizung durch Cochleaimplantate das Überleben der degenerierender Neurone im Spiralganglion fördert (Shepherd et al., 1999).

4.2.2. Wirkung des in die Zerebrospinalflüssigkeit applizierten NT-3

Der in die Zerebrospinalflüssigkeit applizierte NT-3 hatte ebenso eine otoprotektive Wirkung, die aber geringer war (5,6 dB), als die Wirkung des lokal applizierten NT-3 (wenn Albumin und NT-3-behandelte Tiere mit gleicher Applikationsmethode verglichen werden).

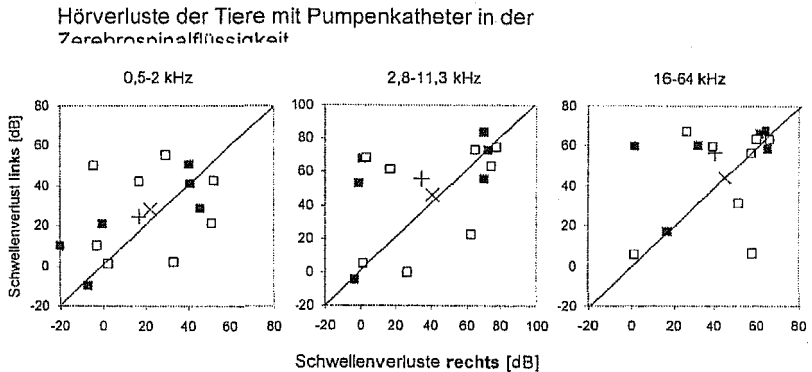


Abbildung 29. Hörschwellenverluste der Tiere mit Pumpenkatheter in der Zerebrospinalflüssigkeit vom 4. Bis 32 Tag nach der Infusion der Ototoxika im Vergleich zu den Hörschwellen vor der Infusion der Ototoxika. Die ausgefüllten Symbole ■ stehen für NT-3-behandelte Tiere (n=7), die leeren □ für die albuminbehandelten (n=8). Die Mittelwerte sind als + für NT-3 und x für Albumin dargestellt.

Die Symmetrie der ototoxischen Hörverluste und der protektiven NT-3-Wirkung war weniger ausgeprägt. Die systemisch mit NT-3 behandelten Tiere hatten rechts niedrigere Verluste als links (Abbildung 29). Für diesen Befund haben wir aber keine Erklärung.

4.3. Otoprotektion durch Radikalfänger und Eisenchelatoren

Die Feststellung, daß Ototoxizität der Aminoglykoside mit der Produktion von freien Radikalen in der Cochlea einher geht (Scha und Schacht, 1999) war der Grund dafür, daß Radikalfänger gegen Hörverluste eingesetzt wurden.

Die stärkste Protektion wurde durch den Radikalfänger Dihydroxybenzoat (bis zu 45 dB; Scha und Schacht, 2000) und α -Liponsäure (bis zu 50 dB; Conlon et al., 1999) erzielt. Anders als in unserem und anderen Experimenten mit Wachstumsfaktoren, war die protektive Wirkung bei den hohen Frequenzen stärker, bei denen auch die Verluste durch Ototoxika höher waren.

4.4. Aurale Entzündungen und Otoprotektion

Bei einigen Tieren in unseren Experimenten wurde vor oder sofort nach der Infusion der Ototoxika eine Entzündung des Mittelohres festgestellt. Diese Tiere wurden für die weiteren Auswertungen nicht verwendet. Allerdings ist zu bemerken, daß die infizierten Ohren oft geringere Schwellenverluste durch die Ototoxika erfuhren, als die nicht infizierten kontralateralen Seiten, wenn sie nicht total hörgeschädigt wurden.

Bemerkenswerte Befunde von Yagi et al. (1999) zeigen, daß eine Behandlung der Cochlea mit Galaktosidase-Vektoren sowohl ipsi- als auch kontralateral eine protektive Wirkung entfaltete, die allerdings schwächer war als die von GDNF. Hier könnte eine Parallele mit der Mittelohrentzündung und dem durch Virus ausgelösten Streß für die Cochlea bestehen.

Tay (et al., 1998) berichtet, daß die Applikation von Albumin in die *Scala tympani* auch eine otoprotektive Wirkung ausübt. Albumin könnte hier ein Fremdprotein gewesen sein, das in der Cochlea einen zusätzlichen Streßfaktor repräsentiert.

Die Ohren, die einem Streßfaktor ausgesetzt werden und eine Entzündungsreaktion daraufhin entwickeln, sind resistenter gegen die hörschädigenden Noxen. Die allgemeine Anstrengung des Körpers durch Infektionen (wenn ein anderes Organ infiziert war) hat dagegen einen erhöhten Hörverlust zur Folge. Ein Beispiel dafür sind die ersten mit Pumpen implantierten Tiere, die an einer Infektion gestorben sind und in unsere Ergebnisse nicht

einbezogen wurden. Sie erfuhren fast ausschließlich totale Hörverluste trotz Infusion der gleichen Ototoxika-Dosis.

Dieser noch umstrittene Befund wurde bisher weder in unserer noch in fremden Arbeitsgruppen untersucht. Die Produktion der Entzündungsfaktoren im Ohr kann noch nicht als gehörschützend angesehen werden, obwohl es zu vermuten ist.

5. Vergleich der Hörschwellen und der Haarzellverluste

5.1. Hörschwellenverluste und die Haarzellen

Nach den physiologischen Versuchen wurden die Cochleae der Tiere histologisch untersucht. Es wurde eine Übereinstimmung der physiologischen und morphologischen Daten festgestellt. Nicht hörgeschädigte Tiere hatten gesunde Corti'sche Organe, total ertaubte Tiere hatten keine oder nur sehr wenige sporadisch vorkommende Haarzellen. Die frequenzspezifischen Hörverluste wurden durch cochleotopisch bestimmte Haarzellverluste untermauert (s.a. Ergebnisse Abschnitte 4.1 und 4.2). Sogar die Cochleae mit geringen Schwellenverlusten, die durch Mikropumpen ausgelöst waren, erwiesen entsprechende Haarzellschäden des Corti'schen Organs.

Daraus können wir schließen, daß die hörschädigenden und otoprotektiven Wirkungen auch oder nur am Corti'schen Organ geschehen. Geringe Verluste der äußeren Haarzellen (bis zu 10%) hatten aber bei den Tieren in unseren Versuchen keine Auswirkung auf die Hörschwellen. Dies weist auch auf die Unbedenklichkeit der angewandten extracochleären Applikationsmethode hin.

5.2. Vergleich der extra- und intracochleären Applikationsmethoden

Trotz mehrerer Vorteile der intracochleären Applikation der Wachstumsfaktoren (geringere Dosierung, sichere Bioverfügbarkeit in der Cochlea, lokale Einschränkung der eventuellen Nebenwirkungen) wurden die Wachstumsfaktoren in unseren Versuchen extracochleär gegeben. Der Hauptgrund dafür war der Schutz der intracochleären Struktur und Homöostase, die bei einer invasiven Operation gestört werden könnte und Hörverluste auslösen würde. Wir befanden die extracochleäre Applikationsart für eleganter und weniger riskant auch im Bezug auf Infektionen oder Entzündungen im Innenohr. Ein weiterer Vorteil der extracochleären Applikation wäre eine einfachere Explantation. Dadurch ist die von uns angewandte Methode therapienäher, aber trotzdem noch verbesserungsfähig.

An den mit Phosphatpuffer (anstatt der Ototoxika) infundierten Tieren wurde eine hörschädigende Wirkung der albuminbeladenen Pumpen festgestellt. Am vierten Tag nach der Implantation der Pumpe wurde ein Schwellenunterschied von durchschnittlich 4,5 dB bei allen Frequenzen, zwischen den mit Pumpe implantierten und nicht implantierten Ohren gefunden. Besonders stark war er bei den hohen und tiefen Frequenzen. In weiteren 32 Tagen nahmen die Verluste zu, die Frequenzspezifität blieb erhalten. Die Ohren mit solchen Schwellenverlusten hatten auch entsprechende Haarzellenverluste in den Cochleae.

Bei Yagi et al. (1999) wurden mit Adenoviren (Träger von GDNF-cDNA) behandelte Tiere beschrieben, die über 40 dB (bei 4 kHz) oder über 60 dB (bei 8 und 16 kHz) Schwellenverluste aufwiesen, aber alle gesunden inneren und nur 14% Verlust der äußeren Haarzellen hatten.

Ein ähnlicher Fall wurde von Shoji et al. (2000) beschrieben, wenn Tiere mit der von Prieskorn und Miller (2000) modifizierter intracochleären Pumpe implantiert und mit GDNF behandelt wurden. Es wurde ein 4%-iger Verlust der äußeren und 1,5%-iger Verlust der inneren Haarzellen festgestellt. Die mittleren Schwellenverluste lagen im Bereich von 25 dB bei 2 kHz bis 46 dB bei 20 kHz.

In diesen Fällen wurden die Cochleae invasiv behandelt. Wie wir selbst festgestellt haben und von Ruan et al. (1999) erwähnt wurde, induzierte die Implantation der intracochleären Katheter die Bildung vom Bindegewebe („einer Gel-ähnlicher Substanz“) in der *Scala tympani*. In den morphologischen Daten (Zahlen der Haarzellen oder der Neurone des Spiralganglions) schlugen sich diese Veränderungen nicht nieder.

Je mehr Zeit nach der cochleainvasiven Operation vergeht, desto weiter schreiten die physiologischen Verluste fort. Von den Autoren wird es aber immer noch bestritten, daß die Pumpenkatheter oder die operativen Invasionen in der Cochlea auf Dauer von mehr als zwei Wochen physiologisch bedenklich sind. Wenn bereits die extracochleären Pumpen Haarzellen- und Hörverluste auslösen, sind die Unbedenklichkeit und Schadenslosigkeit der intracochleären Katheter erst recht unwahrscheinlich.

6. Wirkungsmechanismus von NT-3

Protektive Effekte der neurotrophen Wachstumsfaktoren wurden sowohl gegen akustischen Schaden (durch GDNF: Keithley et al., 1998; Yagi et al., 1999) als auch gegen die Schädigung der Ganglienzellen durch Aminoglykoside (durch NT-3: Ernfors et al., 1996;

durch BDNF: Staecker et al., 1996 oder durch GDNF: Altschuler et al., 1997) beobachtet.

Es könnte ein gemeinsamer Mechanismus für die beiden Schädigungsarten geben, der mit den Wachstumsfaktoren unterbunden wird. Sowohl die Aminoglykoside (Übersicht bei Schacht, 1993) als auch starke akustische Beschallung (Yamane et al., 1995) lösen eine erhöhte Produktion der freien Radikale im Innenohr aus. Radikalfänger vermindern die Schäden im Innenohr, die durch Aminoglykoside (Hoffmann et al., 1988; Sha und Schacht, 2000) oder Überbeschallung (Hu et al., 1997; Yamasoba et al., 1998) ausgelöst wurden.

Unabhängig von der Schädigungsart (durch Aminoglykoside oder durch Beschallung) wurde ein Anstieg des Glutamatspiegels in der Cochlea beobachtet (Matsuda et al., 2000; Puel et al., 1998). Andere diskutierten Mechanismen der Hörschädigung wären eine intrazelluläre Vergiftung mit Calcium (Yamamoto et al., 1994), oder Blockade der Phosphoinositid-Synthese (Schacht, 1976b). Es wurde aber nicht nachgewiesen, daß Wachstumsfaktoren in diese Prozesse eingebunden wären. Nur TGF- α senkte den intrazellulären Calcium-Spiegel in den Zellen des Corti'schen Organs nach Aminoglykosidschädigung *in vitro* (Staecker et al., 1997). Der molekulare Mechanismus dieses Vorgangs ist noch ungeklärt.

Abwesenheit von NT-3 in der Entwicklung bedingt eine verminderte Innervierung des Corti'schen Organs, besonders in den *basalen* Windungen der Cochlea (Ernfors et al., 1995). Der durch Ototoxika ausgelöste Schaden bedingte Verluste auch vorwiegend im *basalen* Teil der Cochlea. Dies führte zu der Hypothese, daß die starken hochfrequenten Schäden durch NT-3 vermindert werden könnten. Sie konnte durch die hier beschriebenen Ergebnisse nicht bestätigt werden, da die Protektion vor Hörverlusten eine umgekehrte Frequenzspezifität besaß.

Der hochaffine GDNF-Rezeptor (der aus Ret- und FGR-1-Untereinheiten besteht) ist in den Zellen zusammen mit Phosphoinositiden und einem transmembranen Protein konjugiert (Treanor et al., 1996). Bei einer Syntheseblockade von Phosphoinositiden könnten die GDNF-Rezeptoren Funktions- oder Lokalisationsstörungen haben, die durch erhöhte GDNF-Präsenz teilweise kompensiert werden könnte. Beim NT-3-Rezeptor wurde über Konjugation mit Phosphoinositiden nicht berichtet.

Sowohl in unserer als auch in vielen anderen Arbeiten (z. B. Shoji et al., 2000) wurde festgestellt, daß die neurotrophen Wachstumsfaktoren nur einen kleinen Bruchteil der gesetzten Hörschäden und strukturellen Verluste im Ohr kompensieren können. Deshalb kommt neurotrophen Faktoren eine unterstützende Rolle bei einer funktionellen Erholung und Erhaltung der geschädigten synaptischen Kontakte zu erst in Frage (Puel et al., 1998). Eine

durch neurotrophe Faktoren ausgelöste Regeneration der Strukturen wurde *in vivo* noch nicht festgestellt. Es wurde aber über eine Trans- oder Neudifferenzierung berichtet (Romand und Chardin, 1999).

7. Zusammenfassung der Rückschlüsse

Diese Versuche haben gezeigt, daß NT-3 gegen akute ototoxische Hörschädigung durch Kanamycin und Ethakrynsäure otoprotektiv wirkt. Die Protektion war unabhängig davon, ob NT-3 lokal am runden Fenster der Cochlea oder systemisch in die Zerebrospinalflüssigkeit gegeben wurde. Auch lokal auf eine Seite applizierter NT-3 verminderte die Schwellenverluste auf beiden Seiten im gleichen Maße (um 9 dB). Bei der systemischen Applikation von NT-3 war seine protektive Wirkung etwas geringer (5 dB).

Die Otoprotektion durch den lokal an das runde Fenster der Cochlea applizierten NT-3 ist stärker (9 dB, diese Arbeit; Sudavicius et al., 2000) als die vom identisch applizierten GDNF (5 dB, Keithley et al., 1998; Shoji et al., 2000), der bis jetzt als der stärkste otoprotektive neurotrophe Faktor galt. NT-3 wirkt auch gegen durch implantierte Pumpen ausgelöste Hörverluste schützend. Diese Wirkung wird nicht spezifisch nur gegen Hörschäden durch Kanamycin und Ethakrynsäure ausgeübt, sondern auch gegen andere Formen der Hörschädigung.

Literaturverzeichnis

- Assad, J. A., Shepherd, G. M. G. und Corey, D. P. (1991) Tip-link integrity and mechanical transduction in vertebrate hair cells. *Neuron* 985-994
- Altschuler, R. A., Miller, J. M., Mitchell, A., Finger, P. A., Bledsoe, S., Luo, J.-C. und Magal, E. (1997) GDNF enhances survival of auditory neurons following drug induced deafness. *Soc. Neurosci.* 23, Abstr. 619
- Beaubien, A.R., Karpinski, K. und Ormsby, E. (1995) Toxicodynamics and toxicokinetics of amikacin in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 83: 62-79
- Berg, K. (1951) The toxic effect of streptomycin on the vestibular and cochlear apparatus. An experimental study in cats. *Acta Otolaryngol.* (Stockh.) Suppl. 97: 1-7
- Berrettini, S., Ravecca, F., Sellarifranceschini, S., Matteucci, F., Siciliano, G. und Ursino, F. (1999) Progressive sensorineural hearing loss in childhood. *Pediatr Neurol* 20 (2): 130-136
- Bobbin, R. P. und Caesar G. (1987) Kynuretic acid and gamma-D-glutamylaminomethylsulfonic acid suppress the compound action potential of the auditory nerve. *Hear. Res.* 25: 77-81
- Bock, G. R., Yates, G. K., Miller, J. J. und Moorjani P. (1983) Effects of N-acetylcysteine on kanamycin ototoxicity in the guinea pig. *Hear. Res.* 9: 255-262
- Borg, E. (1997) Perinatal asphyxia, hypoxia, ischemia and hearing loss - An overview. *Scand.Audiol.* 26 (2): 77-91
- Brown, H. A. und Hinshaw, H. C. (1946) Toxic reaktion of streptomycin on the eight nerve apparatus. *Proc. Staff. Meet. Mayo. Clinic.* 21: 348-51
- Brown, D.R., Watchko, J. F. und Sabo, D. (1996) Neonatal sensorineural hearing loss associated with furosemide - A case-control study. *Dev. Med. Child. Neurol.* 33:816-823
- Brown, J. N., Miller, J. M., Altschuler, R. A. und Nuttall, A. L. (1993) Osmotic pump implant for chronic infusion of drugs into the inner ear. *Hear. Res.* 70: 167-172
- Brummett, R. E., Meike M. B. und Vernon, J. A. (1971) Ototoxicity of tobramycin in guinea pigs. *Arch. Otolaryngol.* 94: 59-63
- Brummett, R. E., Brown, R. T. und Himes D. L. (1979) Quantitative relationships of the ototoxic interaction of kanamycin and ethacrynic acid. *Arch. Otolaryngol.* 105: 240-246
- Brumwell, C.L.; Hossain, W.A.; Morest, D.K.; Bernd, P. (2000) Role for basic fibroblast growth factor (FGF-2) in tyrosine kinase (TrkB) expression in the early development and innervation of the auditory receptor: In vitro and in situ studies. *Exp. Neurol.* 162 (1) 121-145
- Cheng, A. G., Huang, T., Stracher, A., Kim, A., Liu, W., Malgrange, B., Lefebvre, P. P., Schulman, A. und VandeWater, T. R. (1999) Calpain inhibitors protect auditory sensory cells from hypoxia and neurotrophin-withdrawal induced apoptosis. *Brain Res* 850 (1-2) 234-243
- Conlee, J. W., Bennett, M. L. und Creel, D. J. (1995) Differential effects of gentamicin on the distribution of cochlear function in albino and pigmented guinea pigs. *Acta Otolaryngol* (Stokh) 115: 367-374
- Conlon, B. J., Aran, J.-M., Erre, J.-P. und Smith, D. W. (1999) Attenuation of aminoglycoside-induced cochlear damage with the metabolic antioxidant α -lipoic acid. *Hear. Res.* 128: 40-44
- Cortopassi, G. und Hutchin, T. (1994) A molecular and cellular hypothesis for aminoglycoside - induced deafness. *Hear. Res.* 78: 27-30
- Dallos, P. (1975) Electrical correlates of mechanical events in the cochlea. *Audiology* 14: 408-418

- Dallos, P. (1976) Cochlear receptor potentials. In Ruben, R. J., Elbering, C. und Salomon, G. *Electrocochleography*, University Park Press: 5-21
- Dallos, P. (1992) The active cochlea, *J. Neurosci.* 12: 4575-4585
- Dannhof, B. J. und Bruns, V. (1993) The innervation of the organ of Corti in the rat. *Hear. Res.* 66: 8-22
- Davis, H. (1957) Transmission and transduction in the cochlea. *Laryngoscope* 68: 359-382
- De Groot, J. C. M. J., Meeuwse, F., Ruisendaal, W. E. und Veldman, J. E. (1990) Ultrastructural localization of gentamicin in the cochlea. *Hear. Res.* 50: 35-42.
- Desrocher, C. S. und Schacht, J. (1982) Neomycin concentrations in inner ear tissues and other organs in the guinea pig after chronic drug administration. *Acta oto-laryngol.* 93: 233
- Dillier, N. (1992) Mikroelektronische Hörprothesen. Bericht des Nationalen Forschungsprogramms 18, Zürich, Schweiz.
- Ding-Pfennigdorff, D., Smolders, J. W. Th., Müller, M. und Klinke, R. (1998) Hair cell loss and regeneration after severe acoustic overstimulation in the adult pigeon. *Hear. Res.* 120: 109-120
- Durrant, J. D. (1998) Are inner or outer hair cells the source of summing potentials recorded from the round window? *J. Acoust. Soc. Am* 104: 370-377
- Engström, H. und Engström, B. (1978) Structure of hairs on cochlear sensory cells. *Hear. Res.* 1: 49-66
- Ernfors, P., Merilio, J.-P. und Persson, H. (1992) Cells expressing mRNAs for neurotrophins and their receptors during embryonic rat development. *Eur. J. Neurosci.* 4: 1140-1158
- Ernfors, P., Van De Water, T. R., Loring, J. und Jaenisch R. (1995) Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. *Neuron.* 14: 1153-1164
- Ernfors, P., Li Duan, M., ElShamy W. M. und Canlon, B. (1996) Protection of auditory neurons from aminoglycoside toxicity by neurotrophin-3. *Nature Medicine* 2 (4): 463-467
- Ernst, S. (1972) Ethacrynic acid-induced hearing loss in guinea pig. *Acta Otolaryng.* 73: 476-483
- Eybalin, M., Norenberg, M. D. und Renard, N. (1996) Glutamine synthetase and glutamate metabolism in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 101 (1-2): 93-101
- Fermin, C. D. und Igarashi, M. (1983) Aminoglycoside ototoxicity in the chick (*Gallus domesticus*) inner ear: I. The effects of kanamycin and netilmycin on the basilar papilla. *Am. J. Otol.* 4: 174-183
- Flanagan, J. L. und Rabiner, L. R. (1993) *Speech Synthesis*. Dowden, Hutchinson & Ross, Stroudsburg
- Forge, A., Li, L. und Nevoll, G. (1998) Hair cell recovery in the vestibular sensory epithelia of mature guinea pigs. *J. Comp. Neurol.* 397: 69-88
- Forge, A. und Schacht, J. (2000) Aminoglycoside antibiotics. *Audiol. Neuro. Otol.* 5 (1) 3-22
- Fritsch, B., Silos-Santiago, I., Bianchi, L. M. und Farinas, I. (1997) The role of neurotrophic factors in regulating the development of inner ear innervation. *TINS* 20 (4): 159-164
- Fritsch, B., Barbacid, M. und Silos-Santiago, I. (1998) The combined effects of *trkB* and *trkC* mutations on the innervation of the inner ear. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16 (6): 493-505
- Fritsch, B., Pirvola, U. und Ylikoski, J. (1999) Making and breaking the innervation of the ear: neurotrophic support during ear development and its clinical implications. *Cell Tissue Res.* 295 (3): 369-382
- Fukazawa, T., Ishida, K. und Murai, Y. (1999) A micromechanical model of the cochlea with radial movement of the tectorial membrane. *Hear. Res.* 137 (1-2): 59-67
- Gabaizadeh, R., Staeker, H., Liu, W., Kopke, R., Malgrange, B., Lefebvre, P. und Van De Water, T. R. (1997) Protection of both auditory hair cells and auditory neurons from

- ciplatin induced damage. *Acta Otolaryngol* (stockh.) 117: 232-238
- Gao, W.-Q. (1998) "Therapeutic potential of neurotrophins for treatment of hearing loss". *Molecular Neurobiology*, 17(1-3):17-31
- Garetz, S. L., Altschuler, R. A. und Schacht, J. (1994) Attenuation of gentamicin ototoxicity by glutathione in the guinea pig in vivo. *Hear. Res.* 77: 81-87
- Gitter, A. H. und Zenner H.-P. (1990) The cell potential of isolated inner hair cells in vitro. *Hear. Res.* 45: 87-94
- Göttl, K. H., Roesch, A. und Klinke, R. (1985) Quantitative evaluation of ototoxic side effects of furosemide, piretanide, bumetanide, azosemide and ozolinone in the cat - a new approach to the problem of ototoxicity. *Archives of Pharmacology* 331: 275-282
- Goycoolea, M. V. und Lundman, L. (1997) Round window membrane. Structure Function and permeability: a review. *Mikrosk. Res. And Techniq.* 36: 201-211
- Harada, Y. (1977) Morphological changes in the vestibular sensory epithelia after streptomycin intoxication. *Scanning Electron. Microsc.* 1077-1082
- Hashino, E. und Shero, M. (1995) Endocytosis of aminoglycoside antibiotics in sensory hair cells. *Brain Res.* 704: 135-140
- Hashino, E., Shero, M. und Salvi R. J. (1997) Lysosomal targeting and accumulation of aminoglycoside antibiotics in sensory hair cells. *Brain Res.* 777: 75-85
- Hashino, E., Dolnick, R. Y. und Cohan, C. S. (1999) Developing vestibular ganglion neurons switch trophic sensitivity from BDNF to GDNF after target innervation. *J. Neurobiol* 38 (3): 414-427
- Hawkins, J. E. und Jr. Lurie, M. H. (1952) Ototoxicity of streptomycin. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 61: 789-809
- He, C., Kang, S.-J., Dou, Y., Shi, X.-J., Wang, C.-H., Ao, S.-Z. und Lu, C.-L. (1996) Ciliary neurotrophic factor antagonizes gentamicin-induced alterations of electric potentials in auditory pathway in guinea pigs. *Acta Pharmac. Sin.* 17 (6): 493-496
- Heid, S. (1998) Morphologische Befunde am peripheren und zentralen auditorischen System der kongenital gehörlosen weißen Katze. *Dissertationsarbeit an der Universität Frankfurt am Main*, S.8
- Heijmen, P. S., Klis, S. F. L., DeGroot, J. C. M. J. und Smoorenburg, G. F. (1999) Cisplatin ototoxicity and the possibly protective effect of alpha- melanocyte stimulating hormone. *Hear. Res.* 128 (1-2) 27-39
- Hoffman, D. W., Withworth, C. A., Jones-King, K.L. und Rybak, L. P. (1988) Potentiation of ototoxicity by glutathione depletion. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 97: 36-41
- Hu, B. H., Zheng, X. Y., McFadden, S. L., Kopke, R. D. und Henderson, D. (1997) R-phenylisopropyladenosine attenuates noise-induced hearing loss in the chinchilla. *Hear. Res.* 113 (1-2): 198-206
- Hu, B. H., Guo, W., Wang, P. Y., Henderson, D. und Jiang, S. C. (2000) Intense noise-induced apoptosis in hair cells of guinea pig cochleae. *Acta Oto Laryngol* 120 (1): 19-24
- Kaupf, H. und Giebel, W. (1980) Distribution of marked perilymph to the subarachnoidal space. *Europ. Arch. Otolaryngol.* 229: 245
- Keithley, E. M., Ma, C. L., Ryan, A. F., Louis, J.-C. und Magal, E. (1998) GDNF protects the cochlea against noise damage. *NeuroReport* 9: 2183-2187
- Kim, D. O. (1986) Active and non linear cochlear biomechanics and the role of outer-hair-cell subsystems in the mammalian auditory system. *Hear. Res.* 22: 105-114
- Kingma, G. G., Miller, J. M. und Myers, M. W. (1992) Chronic drug infusion into scala tympani of the guinea pig cochlea. *J. Neurosci. Methods* 45: 127-134
- Klinke, R., Göttl, K. H. und Roesch, A. (1981) Testing strategy for ototoxic side effects. *Scand. Audiol.* 14: 95-109
- Klinke, R., Göttl, K.-H. und Roesch, A. (1983) Ototoxic side effect of loop diuretics:

- furosemide, piretanide, bumetanide, azosemide and ozolinone in the cat. Reprint from Naunyn-Schmiedeberg. 322: R117
- Klinke, R. (1986) Neurotransmission in the inner ear. *Hear. Res.* 22: 235-243
- Klinke, R. (1987) Die Verarbeitung von Schallreizen im Innenohr – Eine Übersicht über neuere Forschungsergebnisse. H. N. O. Springer-Verlag; 35: 139-148
- Klinke, R. und Mertens, M. (1988) Quantitative assessment of torasemide ototoxicity. *Arzneim.-Forsch./ Drug. Res.* 38(I). 1a: 153-155
- Knipper, M., Zimmernann, U., Rohbock, K., Köpschall, I. und Zenner, H.-P. (1996) Expression of neurotrophin receptor trkB in rat cochlear hair cells at time rearrangement of innervation. *Cell Tissue Res.* 283: 339-353
- Komune, S. und Snow, J. B. (1981) Potentiating effects of cisplatin and ethacrynic acid in ototoxicity. *Arch. Otolaryngol.* 107: 594-597
- Lauterman, J., Song, B. McLaren, J., Schacht, J. (1995) Diet is a risk factor in cisplatin ototoxicity. *Hear. Res.* 88: 47-53
- Lautermann, J. und Schacht, J. (1996) A sensitive animal model to assess acute and chronic ototoxic effects. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 122:837-840
- Lawani, A. K., Han, J. J., Walsh, B. J., Zozotukhin, S., Muzyczka, N. und Mhatre, A. N. (1997) Green fluorescent protein as a reporter for gene transfer studies in the Cochlea. *Hear. Res.* 114: 139-147
- Lehner, R., Brugger, H., Maassen, M. M. und Zenner, H. P. (1998) A totally implantable drug delivery system for local therapy of the middle and inner ear. *ENT-Journal* 76 (8): 1-3
- Lenhardt, E. (1984) Klinik der Innenohrschwerhörigkeiten. *Arch. Oto-Rhino-Laryngol., Suppl.* 1: 58-218
- Li, L. und Forge, A. (1997) Morphological evidence for supporting cell to hair cell conversion in the mammalian utricular macula. *Int. J. Dev. Neurosci.* 15 (4-5): 433-446
- Liberman, M. C., Dodds, L. W. und Pierce, S. (1990) Afferent and Efferent Innervation of the Cat Cochlea - Quantitative Analysis with Light and Electron Microscopy. *J. Comp. Neurol.* 301: 443-460
- Lim, D. J. (1986) Functional structure of the organ of Corti: a review. *Hear. Res.* 22: 117-146
- Liu, W., Staecker, H., Stupak, H., Malgrange, B., Lefebvre, P. und Vandewater, T. R. (1998) Caspase inhibitors prevent cisplatin-induced apoptosis of auditory sensory cells. *NeuroReport* 9 (11): 2609-2614
- LopezGonzalez, M. A., Delgado, F. und Lucas, M. (1999) Aminoglycosides activate oxygen metabolites production in the cochlea of mature and developing rats. *Hear. Res.* 136:165-168
- Loquet, G., Campo, P. und Lataye, R. (1999) Comparison of toluene-induced and styrene-induced hearing losses. *Neurotoxicol. Teratol.* 21 (6): 689-697
- Malgrange, B., Lefebvre, Ph. P., Martin, D., Staecker, H., Van De Water, Th. R. und Moonen, G. (1996) NT-3 has a tropic effect on process outgrowth by postnatal auditory neurones in vitro. *NeuroReport* 7: 2495-2499
- Malgrange, B., Rogister, B., Lefebvre, Ph. P., Mazy-Servais, C., Welcher, A. A., Bonnet, Ch., Hsu, R.-Y., Rigo, J.-M., Van De Water, Th. R. und Moonen, G. (1998) Expression of growth factors and their receptors in the postnatal rat cochlea, *Neurochemical Research*, Vol. 23, 8: 1133-1138
- Marzella, P. L., Clark, G. M., Shepherd, R. K., Bartlett, P. F. und Kilpatrick T. J. (1997) LIF potentiates the NT-3-mediated survival of spiral ganglia neurones in vitro. *NeuroReport* 8: 1641-1644
- Marzella, P. L., Clark, G. M., Shepherd, R. K., Bartlett, P. F. und Kilpatrick, T. J. (1998) Synergy between TGF-beta 3 and NT-3 to promote the survival of spiral ganglia neurones in vitro. *Neurosci. Lett.* 240(2): 77-80

- Matsuda, K., Komune, Sh., Tono, T., Yamasaki, M., Haruta, A. und Kato, E. (2000) A role of glutamate in drug-induced ototoxicity: in vivo microdialysis study combined with on-line enzyme fluorometric detection of glutamate in the guinea pig cochlea. *Brain Res.* 852: 492-495
- Miller, J. M., Chi, D. H., O'Keeffe L. J., Kruszka, P., Raphael, Y. und Altschuler, R. A. (1997) Neurotrophins can enhance spiral ganglion cell survival after inner hair cell loss. *Int. J. Dev. Neuroscience* 15 (4/5): 631-643
- Morrison, D., Schindler, R. A. und Wersäll (1975) A quantitative analysis of the afferent innervation of the organ of Corti in guinea pig. *Acta oto-laryngol.* 79: 11-23
- Nadol, J. B. (1993) Hearing loss. *N. Engl. J. Med.* 329: 1092-1102
- Nakagawa, T., Yamane, H., Takayama, M., Sunami, K. und Nakai, Y. (1998) Cycloheximide blocks the toxic effect of streptomycin on guinea pig vestibular hair cells. *Acta Oto Laryngol* 36-39
- Ng, P. S., Conley, C. E. und Ing, T. S. (1969) Deafness after ethacrynic acid. *Lancet* 1: 673-674
- Park, G. H., Miller, A. L., Tay, H., Yamasoba, T., Prieskorn, D. M., Magal, E., Altschuler, J. M. und Miller, J. M. (1998) Exogenous GDNF delivered onto the round window membrane prevents aminoglycoside-induced sensorineural hearing loss. *Assoc. Res. In Otolaryngol.*, 21 Mid Winter Res. Meeting, 61: 241
- Pettis, R. M., Han, J. J., Mhatre, A. N. und Lawani, A. K. (1998) Intracochlear infusion of recombinant adeno associated virus: Analysis of its dissemination to near and distant tissues. *Assoc. Res. Otolaryngol.* 21. Abstr. 673
- Pfander, F. (1975) Das Knalltrauma. Analyse, Vorbeugung, Diagnose, Behandlung, Prognose und Begutachtung. Springer Verlag, Berlin
- Pierson, M.G. und Møller, A. R. (1981) Prophylaxis of kanamycin-induced ototoxicity by a radioprotectant. *Hear. Res.* 4: 79-87
- Pirvola, U., Ylikoski, J., Palgi, J., Lehtonen, E., Arumäe, U. und Saarma, M. (1992) Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 mRNAs in the peripheral target fields of developing inner ear ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9915-9919
- Pirvola, U., Saarma, M., Suvanto, P., Arumäe, U. und Ylikoski, J. (1996) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) is a potent trophic factor in the postnatal rat cochlea. *Abstr. Assoc. Res. Otolaryngol.* 527, 143
- Priuska, E. M. und Schacht, J. (1995) Formation of free radicals by gentamycin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem. Pharmacol.* 50: 1749-1752
- Prieskorn, D. M. und Miller J. M. (2000) Technical report: chronic and acute intracochlear infusion in rodents. *Hear. Res.* 140: 212-215
- Puel, J.-L., Ruel, J., Gervais d'Aldin, Ch. And Pujol, R. (1998) Exitotoxicity and repair of cochlear synapses after noise-trauma induced hearing loss. *Neuro Report* 9: 2109-2114
- Raskandersen, H., Ekvall, L., Scholtz, A. und Schrottischer, A. (2000) Structural/audiometric correlations in a human inner ear with noise- induced hearing loss. *Hear. Res.* 141: 129-139
- Richardson, G. P., Forge, A., Kros, C. J., Fleming, J., Brown, S. D., M. und Steel, K. P. (1997) Myosin VIIa is required for aminoglycoside accumulation in cochlear hair cells. *J. of Neurosci.* 17(24): 9506-9519
- Robertson, D (1983) Functional significance of dendritic swelling after loud sounds in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 9: 263-278
- Roizen, N. J. (1999) Etiology of hearing loss in children - Nongenetic causes. *Pediat. Clin. N. Amer.* 46 (1) 49
- Romand, R., und Chardin, S. (1999) Effects of growth factors on the hair cells after ototoxic treatment of the neonatal mammalian cochlea in vitro. *Brain Res.* 825: 46-58

- Ruan, R. S., Leong, S.K., Mark, I. und Yeoh, K. H. (1999) Effects of BDNF and NT-3 on hair cell survival in guinea pig cochlea damaged by kanamycin treatment. *NeuroReport* 10: 2067-2071
- Rubel, E. W., Dew, L. A. und Roberson, D. W. (1995) Mammalian vestibular hair cell regeneration. *Science* 267: 701-703
- Rubinstein, J. T. und Miller, C. A. (1999) How do cochlear prostheses work? *Cur. Opin. Neurobiol.* 9: 399-404
- Russel, J. J. (1983) Origin of the receptor potential in inner hair cells of the mammalian cochlea - evidence of Davis' theory. *Nature* 301: 334-336
- Ryan, A. F. und Dallos, P. (1975) Effect of absence of cochlear outer hair cells of behavioral auditory threshold. *Nature* 253: 44
- Salt, A. N. und Thalmann, R. (1988) Cochlear fluid dynamics. In: A. F. Jahn, J. Santos-Sacchi (Eds.), *Physiology of the ear*. Raven Press., New York, 341-357
- Schacht, J. (1976a) Inhibition by neomycin of polyphosphoinositides in subcellular fractions of guinea pig cortex in vitro. *Neurochem. Res.* 27: 119
- Schacht, J. (1976b) Biochemistry of neomycin ototoxicity. *J. Acoust. Soc. Am.* 59: 940-944
- Schacht, J. (1993) Biochemical basis of aminoglycoside ototoxicity. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 26: 845-856
- Schimmang, Th., Minichiello, L., Vazquez, E., San Chose, I., Giraldez, F., Klein, R. und Represa, J. (1995) Developing inner ear sensory neurons require TrkB and TrkC receptors for innervation of their peripheral targets. *Development*, 121: 3381-3391
- Schlegel, H.G. (1992) *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
- Schneider, W. J. und Becker, E. L. (1966) Acute transient hearing loss after ethacrynic acid therapy. *Arch. Intern. Med.* 117: 715-717
- Schwarz, F. D., Pillay, V. K. G. und Kark, R. M. (1970) Ethacrynic acid: Its usefulness and untoward effects. *Am. Heart J.* 79: 427-728
- Sellick, P. M. und Russel, I. J. (1980) The responses of inner hair cells to basilar membrane velocity during low-frequency auditory stimulation in the guinea pig. *Hear. Res.* 2: 439-445
- Sha, S. H. und Schacht, J. (1996) Amplification of free radicals by gentamicin in a biological system (Abstr.) *Assoc. Res. Otolaryngol.* 19: 30
- Sha, S. H. und Schacht, J. (1999) Formation of reactive oxygen species following bioactivation of gentamicin *Free Radical Biol Med* 26: 341-347
- Sha, S. H. und Schacht, J. (2000) Antioxidants attenuate gentamicin-induced free radical formation in vitro and ototoxicity in vivo: D-methionine is a potent protectant. *Hear. Res.* 142: 34-40
- Shepherd, R. K., Baxi, J. H. und Hardie, N. A. (1999) Response of inferior colliculus neurons to electrical stimulation of the auditory nerve in neonatally deafened cats. *J Neurophysiol* 82 (3): 1363-1380
- Shoji, F., Yamasoba, T., Louis, J. C., Magal, E., Dolan, D. F., Altschuler, R. A. und Miller, J. M. (1998) GDNF protects hair cell from noise damage. *Abstr. Assoc. Res. Otolaryngol.* 21. Abstr. 539
- Shoji, F., Yamasoba, T., Magal, E., Dolan, D. F., Altschuler, R. A. und Miller, J. M. (2000) Glial cell line-derived neurotrophic factor has a dose dependent influence on noise-induced hearing loss in the guinea pig cochlea. *Hear. Res.* 142: 41-55
- Silos-Santiago, I., Fagan, A. M., Garber, M., Fritsch, B. und Barbicid, M. (1997) Severe sensory deficits but normal CNS development in newborn mice lacking trkB and trkC tyrosine protein kinase receptors. *Eur. J. Neurosci.* 9: 2045-2056
- Smolders, J. W. Th. (1995) *Das Gehörorgan der Vögel.. Univ. Frankfurt/M.; Habilitationsschr.* 80-83

- Smolders, J. W. Th. (1999) Functional recovery in the avian ear after cell regeneration. *Audiol. Neurotol.* 4: 286-302
- Sone, M., Schachern, P. A. und Paparella, M. M. (1998) Loss of spiral ganglion cells as primary manifestation of aminoglycoside ototoxicity. *Hear. Res.* 115: 217-223
- Song, B. B. und Schacht, J. (1996) Variable efficacy of radical scavengers and iron chelators to attenuate gentamicin ototoxicity in guinea pig in vivo. *Hear. Res.* 94: 87-93
- Song, B. B. und Schacht, J. (1997) Protection from gentamicin ototoxicity by iron chelators in guinea pig in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 282: 369-377
- Song, B. B., Sha, S.-H. und Schacht, J. (1998) Iron chelators protect from aminoglycoside-induced cochleo- and vestibulo-toxicity. *Free Rad. Biol. Med.* 25: 189-195
- Spoendlin, H. (1969) Innervation patterns in the organ of Corti of the cat. *Acta. Oto-laryngol.* 67: 239-254
- Spoendlin, H. (1971) Degeneration behavior of the cochlear nerve. *Arch. Klin. Exp. Ohr. Nas. Kehlk.-Heilkd.* 200: 275-291
- Staecker, H., Liu, W., Hartnick, Ch., Lefebvre, Ph., Malgrange, B., Moonen, G. und Van De Water, Th. R. (1995) NT-3 combined with CNTF promotes survival of neurons in modiolus-spiral ganglion explants. *NeuroReport* 6: 1533-1537
- Staecker, H., Kopke, R., Malgrange, B., Lefebvre, P. und Van De Water, Th. R. (1996) NT-3 and/or BDNF therapy prevents loss of auditory neurons following loss of hair cells. *NeuroReport* 7: 889-894
- Staecker, H., Dazert, S., Malgrange, B., Lefebvre, P. P., Ryan, A. F. und Van De Water, T. R. (1997) Transforming growth factor alpha treatment alters intracellular calcium levels in hair cells and protects them from ototoxic damage in vitro. *Int. J. Dev. Neurosci.* 14 (4-5): 553-562
- Stöver, T., Gong, T.-W. L., Cho, Y., Altschuler, R. A. und Lomax, M. I. (2000a) Expression of the GDNF family members and their receptors in the mature cochlea. *Molec. Brain Res.* 76: 25-35
- Stöver, T., Yagi, M. und Raphael, Y. (2000b) Contralateral spread of adenovirus after unilateral cochlear gene transfer. *Assoc. f. Res. in Otolaryngol.*, 23 Mid Winter Res. Meeting, 2000, 60: 232
- Sudavicius, T., Smolders, J. W. Th., Mueller, M., Klinke, R. (1997) Hearing loss of kanamycin and ethacrinic acid: Dose response curves in the guinea pig. *Assoc. Res. In Otolaryngol.*, 20 Mid Winter Res. Meeting, 2000 abstr. 523
- Sudavicius, T., Mueller, M. und Smolders, J. (2000) NT-3 reduces hearing loss following aminoglycoside ototoxicity in the guinea pig. *Abstr. Assoc. Res. Otolaryngol.*, 23 Mid Winter Res. Meeting, 2000. Abstr. 165: 575
- Suzuki, M., Yagi, M., Brown, N., Miller, J., Raphael, Y. (2000) The effects of transgenic GDNF expression on gentamicin-induced cochlear and vestibular toxicity. *Assoc. Res. In Otolaryngol.*, 23 Mid Winter Res. Meeting, 2000, 124: 433
- Tay, H. L., Shoji, F., Prieskorn, D. M., Park, G., Magal, E., Altschuler, R. A. und Miller, J. M. (1998) In vivo protection of auditory hair cells from gentamicin ototoxicity by intracochlear administration of GDNF. *Assoc. Res. In Otolaryngol.*, 21 Mid Winter Res. Meeting, 135: 538
- Taylor, M. M. und Creelman, C. D. (1967) Pest: Efficient estimates on probably functions. *J. Acoust. Soc. Am.* 41: 782-787
- Todt, I., Ngezahayo, A., Ernst, A. und Kolb, H. A. (1999) Inhibition of gap junctional coupling in cochlear supporting cells by gentamicin. *Pflugers Arch Eur J Physiol* 438: 685-687
- Treanor, J. J., Goodman, L., de Sauvage, F., Stone, D. M., Poulsen, K. T., Beck, C. D., Gray, C., Armanini, M. P., Pollock, R. A., Hefti, F., Philips, H. S., Goddard, A., Moore, M. W., Buj-Bello, A., Davies, A. M., Asai, An., Takahashi, M., Vandeln, R., Hederson,

- C. E., Rosenthal, A. (1996) Characterization of a multicomponent receptor for GDNF., *Nature* 382: 80-83
- Von Békésy, G. (1960) Experiments in hearing. McGraw-Hill, New York
- Wald, A. (1947) Sequential analysis. John Wiley & Sons, New York
- Wang, J., Ding, D. L., Shulman, A., Stracher, A. und Salvi, R. J. (1999) Leupeptin protects sensory hair cells from acoustic trauma. *Neuroreport*: 10 (4): 811-816
- Wersäll, J. und Hawkins, J.E. Jr. (1961) The vestibular sensory epithelia in the cat labyrinth and their reactions in chronic streptomycin intoxication. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 54: 1-24
- Wersäll, J. und Flock, Å. (1964) Suppression and restoration of the microphonic output from the lateral line organ after local application of streptomycin. *Life Sci.* 3: 1151-5
- Wersäll, J., Björkroth, B., Flock, Å. und Lundqvist, P.-G. (1971) Sensory hair fusion in vestibular sensory cells after gentamicin exposure. A transmission and scanning electron microscope study. *Arch. Klin. Exp. Ohr. Nas. Kehlk. Heilk.* 200: 1-14
- West, B. A., Brummett, R. E. und Himes, D. L. (1973) Interaction of kanamycin and ethacrynic acid. *Arch. Otolaryngol.* 98: 32-37
- Xu, S.-A., Shepherd, R. K., Chen, Y. und Clark, G. M. (1990) Profound hearing loss in the cat following the single co-administration of kanamycin and ethacrynic acid. *Hear. Res.* 70: 205-215
- Yagi, M., Magal, E., Sheng, Z., Ang, K. A. und Raphael, Y. (1999) Hair cell protection from aminoglycoside ototoxicity by adenovirus-mediated overstimulation of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Hum. Gen. Therap.* 10: 813-823
- Yamamoto, T., Kakehata, S., Saito, T., Saito, H.; Akaike, N. (1994) Cisplatin blocks voltage-dependent calcium current in dissociated outer hair cells of guinea-pig cochlea. *Brain Res.* 648: 296-298
- Yamane, H., Nakai, Y., Takayama, M., Iguchi, H., Nakagawa, T. und Kojima, A. (1995) Appearance of free radicals in the guinea pig inner ear after noise-induced acoustic trauma. *Eur. Arch. Otolaryngol.* 252: 504-508
- Yamasoba, T., Nutall, A. L., Harris, C., Raphael, Y. und Miller, J. M. (1998) Role of glutathione in protection against noise-induced hearing loss. *Brain Res.* 784: 82-90
- Yamasoba, T., Schacht, J., Shoji, F. und Miller, J. M. (1999) Attenuation of cochlear damage from noise trauma by an iron chelator, a free radical scavenger and glial cell line-derived neurotrophic factor in vivo. *Brain Res* 815: 317-325
- Ylikoski, J., Pirvola, U., Moshnyakov, M., Palgi, J., Arumäe, U. und Saarma M. (1993) Expression patterns of neurotrophin and their receptor mRNAs in the rat inner ear. *Hear. Res.* 56: 69-78
- Ylikoski, J., Pirvola, U., Vikkala, J., Suvanto, P., Liang, X.-Q., Magal, E., Altschuler, R., Miller, J. M. und Saarma, M. (1998) Guinea pig auditory neurons are protected by glial cell line-derived growth factor from degeneration after noise trauma. *Hear. Res.* 124: 17-26
- Zenner, H.-P. (1994) Hören: Physiologie, Biochemie, Zell- und Neurobiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York
- Zheng, L. J. und Gao, W.-Q. (1999) Concavalin A protects hair cells against gentamicin ototoxicity in rat cochlear explant cultures. *J. Neurobiol.* 39: 29-40

Lebenslauf

Name: Tomas Sudavicius

Geburtsdatum: 7. August 1972

Geburtsort: Vilnius, Litauen

Bildungsweg:

1979-1990 Allgemeine Mittelschule Nr. 48 in Vilnius

1990 I. Platz auf der Schülerolympiade Litauens im Fach Biologie

1990 Abitur

1990-1993 Studium der Biologie an der Universität Vilnius

ab 1993 Austauschstudent an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität, Frankfurt am Main

Sommersemester 1993 Stipendiat der "Gesellschaft der Freunde und Förderer der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität"

August 1993 Vordiplom

Oktober 1993-Oktober 1995 Stipendiat der Hermann-Willkomm-Stiftung

September 1995 Diplomprüfung

Hauptfach: Zoologie

I. Nebenfach: Mikrobiologie

II. Nichtbiologisches Nebenfach: Pharmakologie

Juni 1996 Erhalt des Diploms

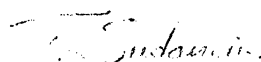
Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Klinke, am Physiologischen Institut III der Johann-Wolfgang-Goethe Universität.

Thema: Der Einfluß von TGF α auf die Ototoxizität von Aminoglycosid-Antibiotika auf das Innenohr des Meerschweinchens

Oktober 1996 Anfang der Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Klinke, am Physiologischen Institut III der Johann-Wolfgang-Goethe Universität.

Stipendiat des Katholischen akademischen Ausländer-Dienstes

Tomas Sudavicius



Frankfurt, 15. August 2000